

VIROLOGIA VETERINÁRIA

Eduardo Furtado Flores
(ORG.)

VIROLOGIA VETERINÁRIA

editora **ufsm**

Santa Maria, 2007

Reitor	Clovis Silva Lima
Vice-reitor	Felipe Martins Müller
Diretor da Editora	Honório Rosa Nascimento
Conselho Editorial	Ademar Michels
	Daniela Lopes dos Santos
	Eduardo Furtado Flores
	Eliane Maria Foletto
	Maristela Bürger Rodrigues
	Honório Rosa Nascimento
	Jorge Luiz da Cunha
	Marcos Martins Neto
	Ronai Pires da Rocha
	Silvia Carneiro Lobato Paraense

Revisão lingüística	Maristela Bürger Rodrigues
Normalização referências bibliográficas	Luzia de Lima Sant'anna
Capa	Marcio Oliveira Soriano sobre fotografia de microscopia eletrônica de células de cultivo infectadas com herpesvírus bovino.
Projeto gráfico e diagramação	Carolina Isabel Gehlen
Ilustrações	Laise Miolo Moraes, Marcio Oliveira Soriano, Eduardo Furtado Flores

V819 Virologia veterinária / Eduardo Furtado Flores (organizador). – Santa Maria : Ed. da UFSM, 2007.
888 p. ; 30 cm.

1. Medicina veterinária 2. Virologia I. Flores, Eduardo Furtado

CDU 619:578

Ficha catalográfica elaborada por Maristela Eckhardt CRB-10/737
Biblioteca Central da UFSM

Direitos reservados à:
Editora da Universidade Federal de Santa Maria
Prédio da Reitoria - Campus Universitário
Camobi - 97119-900 - Santa Maria - RS
Fone/Fax: (55) 3220.8610
e-mail: editora@ctlab.ufsm.br
www.ufsm.br/editora

COLABORADORES

Alice Alfieri, MV, MSc. Doutor

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Londrina, PR, Brasil. 86051-970.
alfieri@uel.br

Amauri A. Alfieri, MV, MSc. Doutor

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Londrina, PR, Brasil. 86051-970.
alfieri@uel.br

Ana Cláudia Franco, MV, MSc., PhD

Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre, RS, Brasil. 90050-170
anafranco@ufrgs.br

Ana Paula Ravazzolo, MV, D.Sc.

Faculdade de Veterinária
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre, RS, Brasil. 91540-000
ana.ravazzolo@ufrgs.br

Clarice Weis Arns, MV, DSc.

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Campinas, SP, Brasil. 13081-970
arns@unicamp.br

Clarissa Silveira Luiz Vaz, MV, MSc., Embrapa Suínos e Aves (CNPQA)

Concórdia, SC, Brasil. 89.700-000,
clarissa.vaz@ufrgs.br

Cláudio Wageck Canal, MV, MSc. Doutor

Departamento de Patologia Clínica Veterinária
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre, RS, Brasil. 91540-000
claudio.canal@ufrgs.br

Diego Gustavo Diel, MV, MSc.

Laboratório de Virologia
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
diegodiel@pop.com.br

Elisabete Takiuchi, MV., MSc. Doutor

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Londrina, PR, Brasil. 86051-970
elisabete.takiuchi@gmail.br

Elizabeth Rieder, PhD.

Plum Island Animal Disease Center ARS, USDA
PO Box 848 Greenport
NY 11944 USA
elizrieder@yahoo.com

Fernanda Silveira Flores Vogel, MV, MSc. Doutor

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
fervogel@mail.ufsm.br

Fernando A. Osorio, MV, MSc. PhD

Department of Veterinary and Biomedical Sciences
University of Nebraska/Lincoln
Lincoln, Nebraska, USA. 68583-0905
fosorio@unlnotes.unl.edu

Fernando Rosado Spilki, MV, MSc., Doutor

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Campinas, SP, Brasil. 13083-970
fernandospilki@yahoo.com.br

Gael Kurath, PhD

Microbiologist Western Fisheries Research Center
6505 NE 65th St.
Seattle, Washington, 98115. USA
gael_kurath@usgs.gov

Gustavo Delhon, MV, MSc.PhD

Department of Pathobiology
College of Veterinary Medicine
University of Illinois at Urbana-Champaign
Urbana, Illinois, USA.
gadelhon@uiuc.edu

Helena Beatriz de Carvalho R. Batista, MV, MSc.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre, RS, Brasil. 91540-000
hruthner@yahoo.com.br

Hernando Duque Jaramillo, MV, MSc. PhD

Plum Island Animal Disease Center
USDA-APHIS-VS-NVSL-FADDL
Greenport, New York USA.
11944-0848

Janice Reis Ciacci-Zanella, MV, MSc.PhD

Embrapa Suínos e Aves (CNPESA)
Concórdia, SC, Brasil. 89.700-000,
janice@cnpsa.embrapa.br

John D. Neill, DVM, PhD

National Animal Disease Center, USDA, ARS
2300 Dayton Avenue. P.O. Box 70
Ames, Iowa, USA. 50010
jneill@nadc.ars.usda.gov

Julia Ridpath. PhD

National Animal Disease Center – ARS - USDA
2300 Dayton Avenue. P.O. Box 70
Ames, IA, USA. 50010
jridpath@nadc.ars.usda.gov

Letícia Frizzo da Silva, MV, MSc.

Laboratório de Virologia
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
diegodiel@pop.com.br

Luciane Teresinha Lovato, MV, MSc., PhD

Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
llovato@smail.ufsm.br

Luiz Carlos Kreutz, MV, MSc., PhD

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Universidade de Passo Fundo (UPF)
Passo Fundo, RS, Brasil. 99001-970
lckreutz@upf.tche.br

Luis L. Rodriguez, MV. PhD

Foreign Animal Disease Research Unit
Plum Island Animal Disease Center ARS, USDA
PO Box 848 Greenport NY 11944. USA.
lrodriguez@piadc.ars.usda.gov

Marcelo de Lima, MV, MSc.

Department of Veterinary and Biomedical Sciences
University of Nebraska/Lincoln
Lincoln, Nebraska, USA. 68683-0905
mdelima2@unlnotes.unl.edu

Maria Elisa Piccone, PhD

Plum Island Animal Disease Center ARS, USDA
PO Box 848 Greenport, NY. 11944. USA
maria.piccone@ars.usda.gov

Mariana Sá e Silva, MV, MSc.

Setor de Virologia
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
msaesilva@yahoo.com.br

Mário Celso Speroto Brum, MV, MSc.

Setor de Virologia
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
mcsbrum@yahoo.com.br

Mauro Pires Moraes, MV, MSc., Doutor

Departamento de Veterinária
Universidade Federal de Viçosa
Viçosa, MG, Brasil. 36570-000
mpmoraes@ars.usda.gov

Paulo Michel Roehe, MV, MSc.PhD

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
FEPAGRO Saúde Animal
Eldorado do Sul, RS, Brasil. 92 990-000 &
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre, RS, Brasil 90 050 -170
proehe@gmail.com

Paulo Renato dos Santos Costa, MV, MSc., Doutor

Departamento de Veterinária
Universidade Federal de Viçosa
Viçosa, MG, Brasil. 36570-000
prenato@ufv.br

Renata Dezengrini, MV, MSc.

Setor de Virologia
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
renatadezengrini@yahoo.com.br

Renata Servan de Almeida, MV, MSc.Doutor

CIRAD - Département Systèmes Biologiques
UPR 15 – Contrôle des Maladies Animales
Exotiques et Emergentes
34398 Montpellier cedex 5 France
renservan@yahoo.com.br

Rudi Weiblen, MV, MSc., PhD

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900
rudi@ccr.ufsm.br

Sheila Wosiacki, MV., MSc. Doutor

Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Estadual de Maringá (UEM)
Campus Umuarama
Maringá, PR, Brasil. 87020-900
wosiacki@yahoo.com.br

Ubirajara M. da Costa, MV, MSc.Doutor

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Tecnologia
Centro de Ciências Agroveterinárias
Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC)
Lages, SC, Brasil. 88520-000
biravetvirus@yahoo.com.br

Zélia Inês Portela Lobato, MV, PhD.

*Escola de Veterinária – Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Belo Horizonte, MG, Brasil. 34992-101
ziplobat@vet.ufmg.br*

INTRODUÇÃO

A presente obra foi concebida para preencher uma lacuna existente na bibliografia dedicada à Virologia Veterinária na língua portuguesa. O crescimento notável do ensino e pesquisa em Virologia Animal no Brasil, nas últimas décadas, infelizmente não foi acompanhado por um aumento equivalente na literatura disponível. Neste período, o acúmulo fantástico de conhecimentos acerca da genética e biologia dos agentes virais, proporcionado pelo desenvolvimento e popularização das técnicas moleculares, tem tornado algumas obras clássicas gradativamente desatualizadas e obsoletas. Existem bons livros de Virologia Animal e excelentes tratados de Virologia Geral e Molecular na língua inglesa. No entanto, esses textos são temporariamente inacessíveis a uma parcela considerável dos estudantes de graduação que se interessam e ingressam no mundo fascinante da Virologia. Esta obra, pois, tem por objetivo fornecer aos iniciantes em Virologia, que, porventura, sejam também iniciantes na língua inglesa, um conteúdo atualizado e abrangente da Virologia Animal, com ênfase aos animais de interesse veterinário.

O presente texto é direcionado aos iniciantes em Virologia, sejam eles estudantes de graduação, pós-graduação ou médicos veterinários; e tem como objetivo fornecer informações básicas sobre a estrutura, biologia, patogenia, diagnóstico e controle dos principais vírus de interesse veterinário. Os principais aspectos da biologia molecular e replicação viral são abordados de maneira simples e de fácil compreensão, para embasar o entendimento da patogenia, resposta imunológica e diagnóstico dessas infecções. A omissão de informações mais detalhadas sobre a biologia molecular dos vírus foi intencional. Tal detalhamento está um pouco além da informação usualmente buscada por iniciantes em livros-texto. Por outro lado, os estudantes em níveis mais avançados podem recorrer a excelentes livros existentes na língua inglesa.

Um grande desafio enfrentado durante a elaboração deste texto foi acompanhar a dinâmica das descobertas e constatações na área da Virologia Molecular. A dinâmica do conhecimento gerado nesta área exigirá atividades de revisão e atualização constantes do conteúdo, sob a pena de deixá-lo obsoleto em poucos anos. Os avanços nas áreas de vacinologia e terapêutica antiviral também se intensificaram neste período, permitindo aos autores relatar as mais recentes conquistas científico-tecnológicas nessas áreas.

A dinâmica das interações dos vírus com os seus hospedeiros no ambiente natural também representa um desafio para a elaboração de textos descritivos. No período de elaboração desta obra – aproximadamente três anos – surgiram novos vírus e novas doenças; e vírus já conhecidos cruzaram a barreira de espécies e infectaram hospedeiros inusitados. Ou seja, a evolução natural das infecções víricas no ambiente natural é tão dinâmica que exige uma revisão contínua de conceitos.

Este livro encontra-se dividido em duas partes. A parte inicial aborda os aspectos gerais da Virologia Animal, discorrendo sobre a estrutura, classificação e nomenclatura, genética e evolução, métodos de detecção e identificação de vírus, aspectos gerais da replicação viral, replicação de vírus DNA e RNA, patogenia das infecções, epidemiologia, imunidade a vírus, diagnóstico laboratorial e vacinas. Embora o enfoque desta parte seja direcionado para a Virologia Animal, os conceitos e aspectos nela tratados são também aplicáveis a vírus que infectam humanos. Assim, este texto pode ser útil também para os demais estudantes das áreas biomédicas.

A segunda parte trata individualmente das famílias virais de importância em medicina veterinária. Os capítulos foram elaborados seguindo algumas orientações com relação à organização e conteúdo. Dessa forma, cada capítulo específico é dividido em duas partes: a seção inicial aborda os aspectos gerais da respectiva família, a estrutura dos vírions, a estrutura e organização genômica, expressão gênica, replicação do genoma e o ciclo replicativo. Um dos maiores desafios enfrentados na elaboração deste texto foi obter um equilíbrio entre o nível de aprofundamento nos aspectos biológicos e moleculares com a ênfase necessária nos aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e diagnósticos. Os aspectos moleculares da biologia dos vírus foram abordados de maneira simplificada para facilitar o entendimento por iniciantes da área. Um maior detalhamento nos aspectos biológicos e moleculares da estrutura e replicação dos vírus pode ser encontrado nos livros especializados.

A segunda parte de cada capítulo específico é dedicada às doenças de importância veterinária causadas por membros das respectivas famílias. Esta seção discorre acerca das características do agente, epidemiologia, patogenia, sinais clínicos e patologia, diagnóstico, controle e profilaxia das doenças por ele causadas. Algumas famílias possuem vários vírus associados com doenças animais de importância sanitária e econômica; enquanto outras possuem poucos patógenos animais. Por isso, a disparidade de conteúdo e extensão dos diferentes capítulos. O último capítulo apresenta algumas famílias virais que possuem importância limitada em medicina veterinária. Algumas dessas famílias abrigam patógenos exclusivamente humanos; outras abrigam vírus que infectam somente animais sem interesse econômico ou afetivo; enquanto outras congregam vírus cujo interesse maior reside nos seus aspectos biológicos e moleculares.

Os autores

AGRADECIMENTOS

Uma obra deste porte somente poderia ser elaborada com a colaboração de várias pessoas. E nada mais justo do que agradecer a todos aqueles que tornaram possível concretizá-la. Aos colegas colaboradores, pela disposição em dedicar uma parte importante do seu tempo na elaboração dos capítulos. É desnecessário listá-los aqui, pois os seus nomes se encontram nos respectivos capítulos ou seções.

Aos colegas e amigos de longa data, com quem a elaboração de um livro de Virologia Veterinária foi tema de inumeráveis conversas e planos em congressos e reuniões científicas nestes últimos 15 anos. À Janice Ciacci-Zanella, Clarice Arns, Ana Paula Ravazollo, Amauri Alfieri, Luciane Lovato, Mauro Moraes, Paulo Roehe, Luiz Carlos Kreutz e Rudi Weiblen, entre outros, o meu agradecimento e a certeza de que este livro representa a concretização de um sonho de todos nós.

O agradecimento aos colegas estrangeiros, que entenderam a importância de um livro-texto como este e dedicaram parte de seu tempo para auxiliar a elaborá-lo: Drs. Julie Ridpath, John Neill, Luis Rodriguez, Gael Kurath, Fernando Osorio, Maria Elisa Piccone, Gustavo Delhon, Elisabeth Rieder e Hernando Duque.

Devo um agradecimento especial a três colegas que contribuíram muito além da elaboração dos respectivos capítulos, participando de vários outros, enviando sugestões, traduzindo, revisando e reformulando os textos submetidos: Dr Luiz Carlos Kreutz, Dra. Fernanda Silveira Flores Vogel e Méd. Vet. doutoranda Renata Dezengrini.

Gostaria de externar o meu reconhecimento e gratidão à equipe do Setor de Virologia da UFSM, composta por mestrandos e doutorandos, que participaram ativamente de todo o processo de elaboração, edição e revisão desta obra. Grande parte da qualidade e propriedade deste texto se deve às intermináveis discussões e revisões de capítulos, patrocinadas por um grupo cheio de entusiasmo e motivação. Ao Mário Celso S. Brum, Diego G. Diel, Evandro Winkelmann, Sabrina R. Almeida, Sandra Arenhart, Andréia Henzel, Renata Dezengrini, Mariana Sá e Silva, Helton dos Santos, Letícia Frizzo da Silva e Marcelo Weiss, com certeza de que vocês possuem parte importante nessa obra.

Agradeço também aos colegas professores Sílvia Hübner (UFPEL) e Valéria Lara Carregaro (UFSM) pelas revisões e colaboração em capítulos específicos. À profa. Maristela Bürger Rodrigues, pela revisão gramatical; Carolina Gehlen, pela diagramação; Zélida Bayer Zucheto e prof. Honório Rosa Nascimento, da Editora da UFSM, pelo apoio para que a edição deste livro fosse possível.

Além do apoio da Editora da UFSM, parte do trabalho gráfico (elaboração de figuras, diagramação, revisão gramatical) e pagamento de direitos autorais foram custeados com recursos da taxa de bancada de Produtividade em Pesquisa do CNPq do Organizador. A arte final e capa somente foram possíveis com o auxílio do Centro de Ciências Rurais, na pessoa do seu Diretor, prof. Dalvan José Reinert, e da vice-reitoria, pelo Prof. Felipe Müller, a quem agradecemos.

Quero também manifestar o meu agradecimento e admiração pelo trabalho gráfico magnífico realizado pelos acadêmicos do Curso de Desenho Industrial da UFSM, Laíse Miolo Moraes e Márcio Oliveira Soriano. Eles foram os responsáveis diretos por grande parte das ilustrações desta obra; e responsáveis indiretos pela parte restante, cuja confecção lhes foi subtraída pelo seu entusiasmado aprendiz. Ao final do trabalho, tivemos como resultados: um conjunto formidável de ilustrações; dois

acadêmicos de Desenho Industrial com certo conhecimento de Virologia e um virologista apaixonado pela arte de ilustrar graficamente a biologia dos vírus. E isso é só o início...

Eduardo Furtado Flores, MV. MSc. PhD
Professor Associado
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP)
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.
97105-900 – flores@ccr.ufsm.br

Eduardo Furtado Flores é natural de Santa Maria, RS (25/10/61); com graduação (1983) e mestrado (1989) em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Possui PhD em Virologia Molecular pela Universidade de Nebraska/Lincoln, Estados Unidos (1995). É professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM desde 1991, responsável pelas disciplinas de Epidemiologia Geral Veterinária e Saúde Pública Veterinária na graduação; e pelas disciplinas Epidemiologia Veterinária, Virologia Molecular e Introdução à Biologia Molecular na pós-graduação. Faz parte do Conselho Editorial da Editora da UFSM; é pesquisador de produtividade em pesquisa (1C) do CNPq desde 1997; e editor adjunto de Virologia da revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Divide as suas atividades didáticas e editoriais com a rotina de diagnóstico virológico no Setor de Virologia (SV/UFSM) e com a orientação de bolsistas de iniciação científica, mestrado e doutorado. Coordena pesquisas nas áreas de epidemiologia molecular e patogenia das infecções pelos vírus da diarreia viral bovina e herpesvírus bovino tipos 1 e 5.

SUMÁRIO

Parte I - Virologia Geral

1 Estrutura e composição dos vírus	19
<i>Eduardo Furtado Flores</i>	
2 Classificação e nomenclatura dos vírus	37
<i>Luciane Teresinha Lovato</i>	
3 Detecção, identificação e quantificação de vírus	59
<i>Mário Celso S. Brum & Rudi Weiblen</i>	
4 Genética e evolução viral	87
<i>Mauro Pires Moraes & Hernando Duque Jaramillo</i>	
5 Replicação viral	107
<i>Eduardo Furtado Flores & Luiz Carlos Kreutz</i>	
6 Replicação dos vírus DNA	137
<i>Gustavo Delhon</i>	
7 Replicação dos vírus RNA	165
<i>Maria Elisa Piccone & Eduardo Furtado Flores</i>	
8 Patogenia das infecções víricas	189
<i>Eduardo Furtado Flores</i>	
9 Resposta imunológica contra vírus	237
<i>Luiz Carlos Kreutz</i>	
10 Epidemiologia das infecções víricas	261
<i>Eduardo Furtado Flores</i>	
11 Diagnóstico laboratorial de infecções víricas	295
<i>Eduardo Furtado Flores</i>	
12 Vacinas víricas	327
<i>Cláudio Wageck Canal & Clárisa Silveira Luiz Vaz</i>	

Parte II - Virologia Especial

13	<i>Circoviridae</i>	361
	<i>Janice R. Ciacchi-Zanella</i>	
14	<i>Parvoviridae</i>	375
	<i>Mauro Pires Moraes e Paulo Renato da Costa</i>	
15	<i>Papillomaviridae</i>	397
	<i>Amauri Alfieri, Alice Alfieri & Sheila Wosiacki</i>	
16	<i>Adenoviridae</i>	413
	<i>Mauro Pires Moraes & Paulo Renato da Costa</i>	
17	<i>Herpesviridae</i>	333
	<i>Ana Cláudia Franco & Paulo Michel Roehe</i>	
18	<i>Poxviridae</i>	489
	<i>Cláudio Wageck Canal</i>	
19	<i>Asfarviridae</i>	513
	<i>Gustavo Delhon</i>	
20	<i>Caliciviridae</i>	525
	<i>John Neill</i>	
21	<i>Picornaviridae</i>	537
	<i>Elisabeth Rieder & Mário Celso S. Brum</i>	
22	<i>Flaviviridae</i>	563
	<i>Julia Ridpath & Eduardo Furtado Flores</i>	
23	<i>Togaviridae</i>	593
	<i>Eduardo Furtado Flores</i>	
24	<i>Coronaviridae</i>	613
	<i>Luciane Teresinha Lovato & Renata Dezengrini</i>	
25	<i>Arteriviridae</i>	639
	<i>Marcelo de Lima & Fernando A. Osorio</i>	
26	<i>Paramyxoviridae</i>	657
	<i>Clarice Weis Arns, Fernando R. Spilki & Renata Servan de Almeida</i>	
27	<i>Rhabdoviridae</i>	689
	<i>Luis Rodriguez, Helena R. Batista, Paulo Michel Roehe & Gael Kurath</i>	

28 Orthomyxoviridae	721
<i>Eduardo Furtado Flores, Luciane T. Lovato, Mariana Sá e Silva, Renata Dezengrini & Diego G. Diel</i>	
29 Bunyaviridae	755
<i>Fernanda Silveira Flores Vogel</i>	
30 Reoviridae	773
<i>Amauri Alfieri, Alice Alfieri, Elisabete Takiuchi & Zélia I. P. Lobato</i>	
31 Retroviridae	809
<i>Ana Paula Ravazzollo & Ubirajara da Costa</i>	
32 Outras famílias virais	839
<i>Fernanda Silveira Flores Vogel & Eduardo Furtado Flores</i>	
Abreviaturas e siglas	861
Glossário	871

PARTE I
VIROLOGIA GERAL

ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS VÍRUS

Eduardo Furtado Flores

1

1	Introdução	21
2	Estrutura das partículas víricas	21
2.1	O genoma	23
2.2	O capsídeo	25
2.3	O envelope	28
2.4	A matriz	29
3	Proteínas virais	30
4	Outros componentes dos vírions.....	31
4.1	Enzimas	31
4.2	Outras proteínas virais	31
4.3	Lipídios	31
4.4	Carboidratos	31
4.5	Ácidos nucléicos celulares.....	31
4.6	Proteínas celulares	32
5	Partículas víricas anômalas	32
6	Propriedades físico-químicas	33
7	Bibliografia consultada	33

1 Introdução

Os vírus são os microorganismos menores e mais simples que existem. São muito menores do que células eucariotas e procariotas e, ao contrário destas, possuem uma estrutura simples e estática. Esses agentes não possuem a maquinaria necessária para a produção de energia metabólica e para a síntese de proteínas e, por isso, necessitam das funções e do metabolismo celular para se multiplicar. Fora de uma célula viva os vírus são estruturas químicas. A sua atividade biológica só é adquirida no interior de células vivas, por isso são parasitas intracelulares obrigatórios.

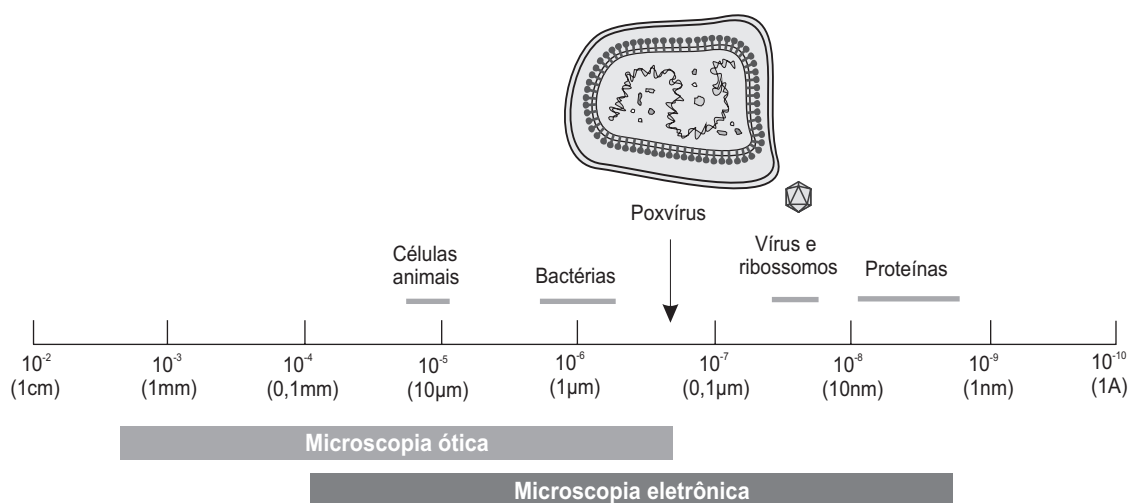
O genoma viral – ácido ribonucleico (RNA) ou desoxirribonucleico (DNA) – codifica apenas as informações necessárias para assegurar a sua multiplicação, empacotamento do genoma e para subversão de funções celulares em benefício da sua multiplicação. Ao contrário de células eucariotas e procariotas, os vírus não crescem ou se dividem; e sim são produzidos pela associação dos seus componentes pré-formados no interior da célula infectada.

A palavra *vírus* é utilizada para designar o agente biológico, o microorganismo. A estrutura física é denominada partícula viral, partícula ví-

rica ou simplesmente vírion. A nomenclatura utilizada para designar as diversas hierarquias da classificação taxonômica dos vírus (ordem, família, subfamília, gênero, espécie) será apresentada no Capítulo 2. No presente capítulo, a terminologia vernacular será utilizada. Por exemplo: o termo *picornavírus* será utilizado para referir-se aos membros da família *Picornaviridae*; os membros da família *Orthomyxoviridae* serão chamados de *ortomixovírus*.

2 Estrutura das partículas víricas

A unidade fundamental – o indivíduo – dos vírus é denominada *partícula vírica*, *partícula viral* ou simplesmente *vírion*. As dimensões, morfologia e complexidade das partículas víricas variam amplamente entre os vírus das diferentes famílias. A grande maioria dos vírions possui dimensões ultramicroscópicas, com diâmetro que varia entre 15 e 22 nanômetros (nm) nos circovírus; e entre 200 e 450 nm nos poxvírus; e só pode ser visualizada sob microscopia eletrônica (ME). As exceções são alguns poxvírus que são maiores e podem ser visualizados sob microscopia ótica (Figura 1.1).



Fonte: adaptado de Flint et al.(2000).

Figura 1.1. Escala logarítmica métrica, ilustrando as dimensões dos vírus comparativamente com células animais, bactérias e macromoléculas. O poder de resolução das microscopias ótica e eletrônica é indicado por barras.

De acordo com a estrutura básica das partículas, dois grupos principais de vírus podem ser reconhecidos: os vírus sem envelope e os vírus com envelope (Figura 1.2). Os vírions mais simples são compostos pelo genoma recoberto por uma camada simples de proteína, denominada *capsídeo*. Os vírus mais complexos possuem genomas longos associados com várias proteínas, recobertos por capsídeos complexos, revestidos externamente por uma membrana lipoprotéica de origem celular, denominada envelope. As camadas protéicas que envolvem o genoma (capsídeo, envelope) são freqüentemente denominadas de envoltórios virais. Os conceitos principais relacionados à estrutura e componentes dos vírions estão apresentados no Quadro 1.1.

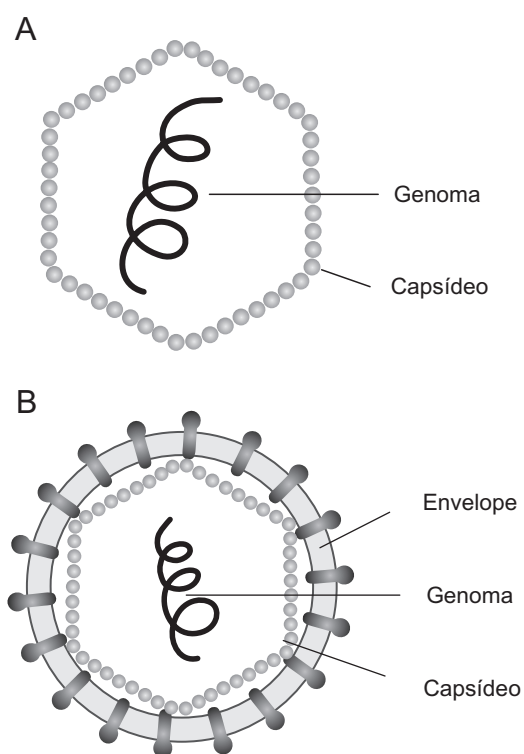


Figura 1.2. Estrutura fundamental das partículas víricas e seus componentes. Representação esquemática de um vírion sem envelope (A) e com envelope (B).

A função primordial dos envoltórios virais (capsídeo e envelope) é proteger o genoma de danos físicos, químicos ou enzimáticos durante a transmissão entre células e entre hospedeiros. Nessa etapa, os vírions podem ser expostos a

condições ambientais que rapidamente inativariam o ácido nucléico. Por isso, o capsídeo e o envelope são críticos para a manutenção da integridade e viabilidade do genoma, que contém as informações essenciais para a multiplicação do vírus. Outras funções importantes dos componentes superficiais das partículas víricas são o reconhecimento e interação com estruturas da membrana da célula hospedeira. Essas interações são essenciais para a penetração do agente na célula e início da sua replicação.

A arquitetura e modo com que as partículas víricas são construídas devem permitir o desempenho de duas funções fundamentais: a) proteção do genoma durante o transporte entre células e entre hospedeiros, e b) liberação do genoma íntegro e viável após a penetração na célula hospedeira. A evolução fez com que a arquitetura das partículas víricas tenha sido adequada para cumprir essas tarefas. Ou seja, os vírions são resistentes o suficiente para proteger o genoma no exterior das células e são facilmente desintegrados ao penetrarem na célula hospedeira, para permitir a pronta liberação do genoma no seu interior. Essas duas propriedades, aparentemente opostas, que são particularmente bem evidentes em alguns vírus sem envelope, caracterizam o que se convencionou denominar de estrutura metaestável.



VÍRUS - DEFINIÇÕES E CONCEITOS

- O *genoma* é constituído por RNA ou DNA.
- O *capsídeo* é a camada protéica que recobre o genoma.
- Os *protômeros* são as unidades protéicas que compõe o capsídeo.
- Os *capsômeros* são as unidades morfológicas do capsídeo.
- O *nucleocapsídeo* é a estrutura formada pelo genoma + capsídeo.
- O *envelope* é a membrana lipoprotéica que recobre o nucleocapsídeo.
- O *virion* é a partícula vírica completa, infecciosa.

Quadro 1.1. Conceitos e definições fundamentais.

2.1 O genoma

O genoma dos vírus é constituído por moléculas de ácido ribonucleico (RNA) ou desoxirribonucleico (DNA), nunca pelos dois. Por isso, esses agentes são comumente denominados de *vírus RNA* ou *vírus DNA*. Em geral, os vírus das diversas famílias contêm apenas uma cópia do genoma por vírion (são haplóides). Uma exceção são os retrovírus, que possuem duas cópias idênticas do genoma (são diplóides). A extensão, estrutura, organização genômica e o número de genes contidos no genoma variam amplamente entre os diferentes vírus. Os menores vírus animais (circovírus) possuem uma molécula de DNA com aproximadamente 1.700 nucleotídeos (1,7 *quilobases*, kb) como genoma; os vírus maiores possuem um genoma DNA com mais de 350 kb (poxvírus). O número de genes – e consequentemente o número de proteínas codificadas – também varia entre os diferentes vírus. Alguns vírus de plantas codificam apenas uma proteína, enquanto o genoma dos poxvírus codifica mais de 100.

Em geral, o genoma dos vírus é muito compacto e codifica apenas as proteínas essenciais para assegurar a sua replicação e transmissão. Resumidamente, essas funções compreendem: a) assegurar a replicação do genoma (enzimas polimerases de RNA e DNA e proteínas acessórias); b) subverter funções celulares em seu benefício (protease *leader* no vírus da febre aftosa [*foot and mouth disease virus*, FMDV]) e c) empacotar o genoma (proteínas do capsídeo e envelope). Essas funções são codificadas pelo genoma de, virtualmente, todos os vírus. Alguns vírus mais complexos codificam funções adicionais que, de alguma forma, favorecem a sua multiplicação e disseminação.

O tipo e estrutura do genoma de muitos vírus diferem do padrão clássico observado nos ácidos nucleicos de eucariotas e procariotas. Nesses organismos, o genoma é constituído por moléculas de DNA de cadeia dupla (ds, *double-stranded*); enquanto os RNAs possuem fita simples (ss, *single-stranded*). Os genomas dos vírus apresentam variações de tipo e estrutura, que incluem

desde genomas de DNA de fita simples (ssDNA) até RNA de fita dupla (dsRNA) (Tabelas 1.1 e 1.2, em anexo).

A maioria dos vírus DNA possui o ácido nucleico genômico como uma molécula de fita dupla. As exceções são os parvovírus (cadeia simples linear), os circovírus (cadeia simples circular) e os hepadnavírus (cadeia parcialmente dupla). O termo circular refere-se à continuidade da cadeia de DNA e não à forma geométrica adotada pela molécula. Ao contrário dos genomas lineares, que apresentam as extremidades livres, os genomas circulares apresentam a cadeia contínua, sem extremidades.

Os poliomavírus e papilomavírus possuem uma molécula de DNA de cadeia dupla circular. Essa molécula apresenta-se enrolada/tensionada sobre o seu eixo longitudinal (do inglês: *supercoiled*) e está associada com proteínas celulares denominadas *histonas*, tanto nas células infectadas como nos vírions. Os parvovírus possuem uma molécula de DNA de cadeia simples, cujas extremidades possuem seqüências complementares invertidas (*palindromes*). Essa característica permite que as extremidades do genoma se dobrem sobre si mesmas, pareando com a sua região complementar e formando estruturas semelhantes a grampos de cabelo (*hairpins*). Os genomas dos adenovírus e herpesvírus são moléculas de DNA de cadeia dupla linear. Nos herpesvírus, o genoma é linear apenas nos vírions, pois assume a topologia circular (devido ao pareamento complementar nas extremidades) logo após a entrada no núcleo da célula. O genoma dos hepadnavírus é uma molécula de DNA de cadeia parcialmente dupla (aproximadamente 3/4), o restante possui cadeia simples. As extremidades da cadeia completa fazem um pareamento de bases entre si, conferindo à molécula a topologia circular (a cadeia de DNA não é contínua). Os poxvírus possuem uma molécula de DNA de cadeia dupla linear; porém as duas cadeias são contínuas, ou seja, não há extremidades livres. Uma ilustração simplificada da morfologia das partículas e da topologia do genoma dos vírus DNA está apresentada na Figura 1.3.

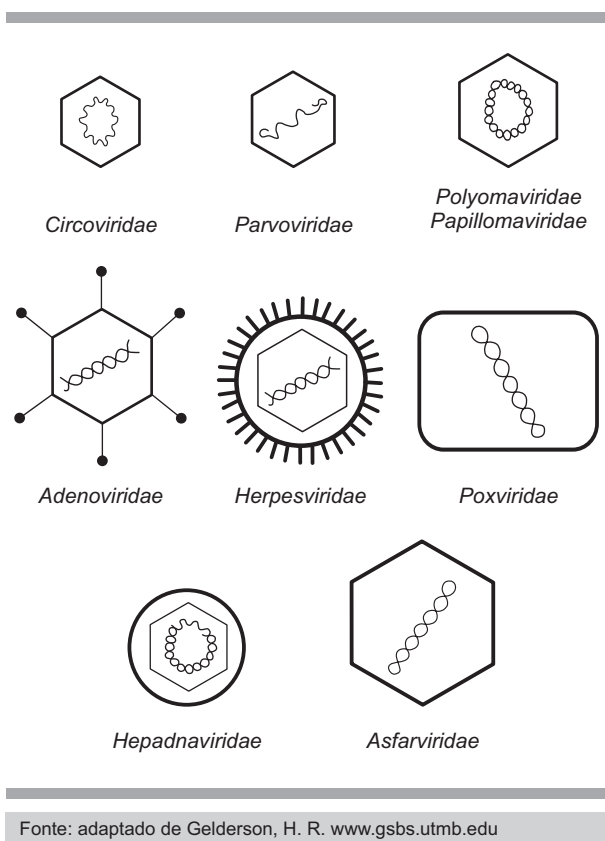


Figura 1.3. Ilustração simplificada da morfologia dos vírions e da topologia do genoma dos vírus DNA.

O ácido nucléico genômico de todos os vírus RNA é composto por moléculas lineares. Em algumas famílias (*Orthomyxoviridae* e *Bunyaviridae*), essas moléculas circularizam pelo pareamento de seqüências complementares, localizadas nas extremidades, formando estruturas que lembram cabos de panela (*panhandles*). A maioria dos vírus RNA possui o seu ácido nucléico genômico como uma molécula de cadeia simples. As exceções são os reovírus e os birnavírus, cujos genomas são formados por segmentos de RNA de cadeia dupla (10 a 12 segmentos nos reovírus, dois nos birnavírus). Os genomas dos vírus RNA de cadeia simples podem ser constituídos por uma única molécula (não-segmentados) ou por mais de uma molécula (genomas segmentados: sete a oito moléculas de RNA nos ortomixovírus, três nos bunivírus e duas nos arenavírus).

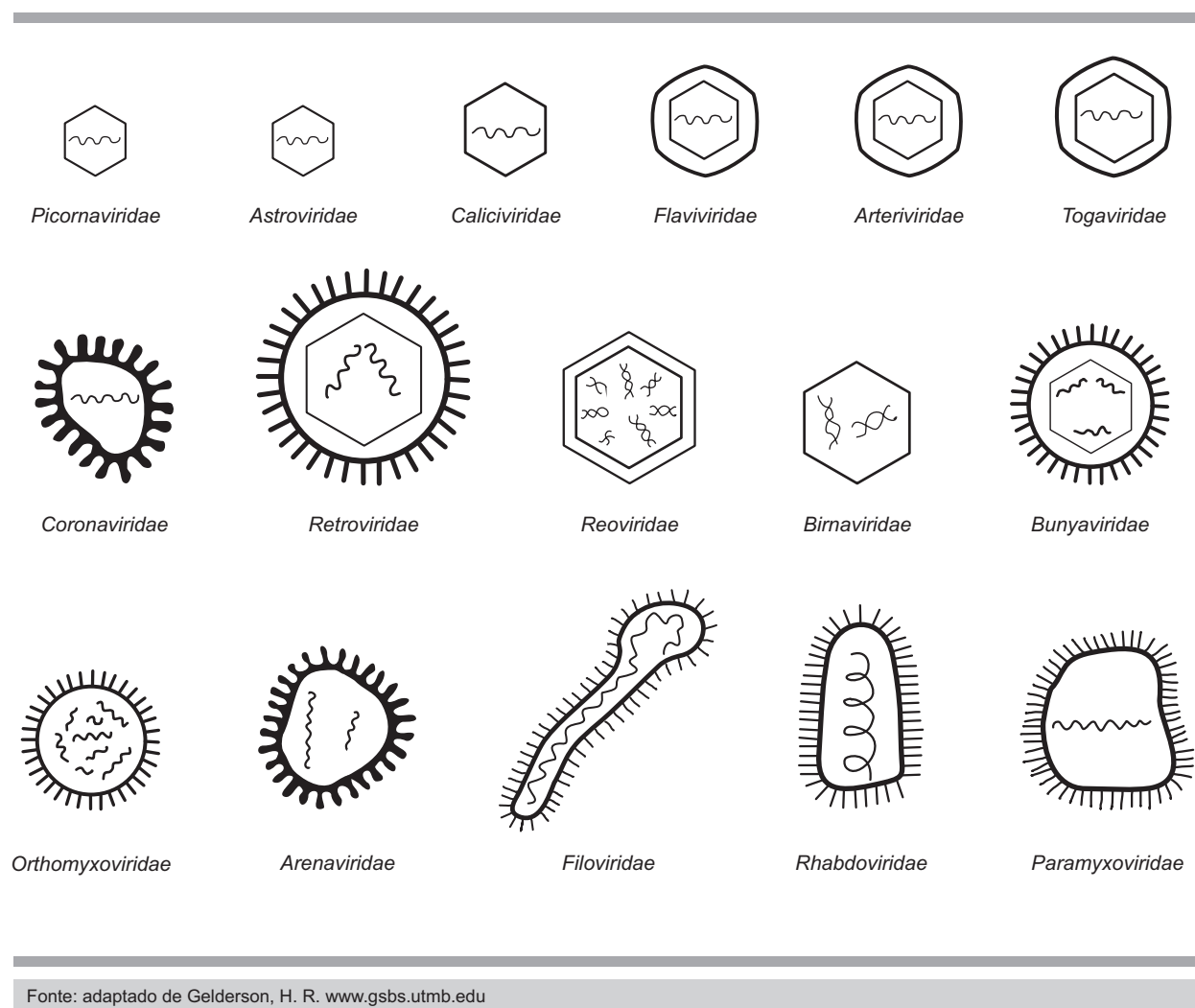
O genoma de alguns vírus RNA de cadeia simples possui o mesmo sentido do RNA mensageiro (mRNA) e pode ser diretamente traduzido pelos ribossomos da célula hospedeira. Isso é

possível porque a seqüência de nucleotídeos, que codifica os aminoácidos constituintes da proteína, está alinhada no mesmo sentido da seqüência genômica. Esses mRNA (e os respectivos vírus) são denominados RNA de sentido ou polaridade positiva; ou simplesmente RNA+. A primeira etapa intracelular do ciclo replicativo desses vírus é a tradução parcial ou total do RNA genômico, resultando na produção de proteínas virais, entre as quais a enzima polimerase de RNA (*replicase*), que irá replicar o genoma.

Outros vírus RNA de cadeia simples possuem genomas que não podem ser diretamente traduzidos, pois possuem o sentido contrário (*antissense*) ao mRNA. Esses genomas (e os respectivos vírus) são denominados de RNAs de sentido ou polaridade negativa (RNA-). Esses vírus trazem a enzima polimerase de RNA nos vírions para permitir o início da replicação do genoma. A etapa inicial da replicação é a síntese de uma cópia de RNA de polaridade positiva (mRNA) a partir do RNA genômico. Ou seja, nesses vírus, a síntese protéica ocorre pela tradução do mRNA, que possui sentido antígeno.

Os genomas RNA dos bunivírus e arenavírus não são diretamente traduzidos pelos ribossomos, sendo considerados RNA de sentido negativo. Esses RNAs servem de molde para a transcrição e produção de cópias de RNA de sentido positivo (RNA+ ou mRNA) de extensão parcial ou total do genoma. No entanto, em alguns desses vírus, um dos segmentos de RNA codifica proteínas tanto no sentido do genoma como na molécula de sentido oposto (antígeno). Essa estratégia de expressão gênica é denominada *ambissense* e é uma característica única dessas famílias.

Nos reovírus e birnavírus (genomas RNA segmentados de fita dupla), a cadeia negativa serve de molde para a transcrição e produção de mRNA (RNA- → RNA+). A cadeia complementar de RNA genômico (sentido positivo) não é traduzida. Essa molécula serve apenas de molde e para parear com a cadeia negativa. A Figura 1.4 apresenta uma ilustração simplificada da morfologia dos vírions e topologia do genoma dos vírus RNA.



Fonte: adaptado de Gelderson, H. R. www.gsbs.utmb.edu

Figura 1.4. Ilustração simplificada da morfologia dos vírions e da topologia do genoma dos vírus RNA.

2.2 O capsídeo

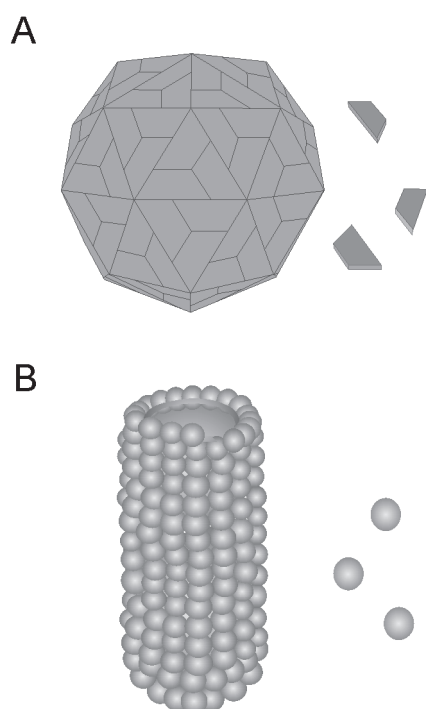
O *capsídeo* (também chamado de *cápsula*) é a camada protéica que recobre externamente o genoma. Nos vírus que não possuem envelope, o capsídeo representa o único envoltório do ácido nucléico viral. Além dessa cobertura protéica, o genoma de alguns vírus encontra-se associado com uma ou mais proteínas de origem viral (p. ex.: adenovírus e reovírus) ou da célula hospedeira (poliomavírus e papilomavírus). As proteínas que estão associadas ao genoma geralmente possuem caráter básico, sendo formadas predominantemente por aminoácidos com carga positiva. Essa estrutura, geralmente compacta (genoma + proteínas associadas), é denominada *core* ou núcleo. O conjunto formado pelo core + capsídeo é comumente denominado *nucleocapsídeo*. Nos vírus envelopados, o nucleocapsídeo é recoberto

externamente pela membrana lipoprotéica que constitui o envelope (Figura 1.2).

A função do capsídeo é proteger o material genético e proporcionar a transferência do vírus entre células e entre hospedeiros. Nos vírus sem envelope, a superfície externa do capsídeo é responsável pelas interações iniciais dos vírions com a célula hospedeira no processo de penetração do vírus. Nesses vírus, as proteínas localizadas na superfície do capsídeo também interagem com componentes do sistema imunológico e são alvos importantes para anticorpos com atividade neutralizante.

Os capsídeos são formados pela associação de subunidades protéicas denominadas *protômeros*, que se constituem nas suas unidades estruturais. A associação dessas proteínas pode formar estruturas tridimensionais bem definidas, geralmente na forma de pequenas saliências visíveis na superfície dos vírions. Essas estruturas consti-

tuem-se nas unidades morfológicas do capsídeo, também denominadas *capsômeros*. Cada capsômero pode ser formado por uma única proteína, pela associação de moléculas de uma mesma proteína ou por diferentes proteínas (Figura 1.5).



Fonte: adaptado de Flint et al. (2000).

Figura 1.5. Duas simetrias principais dos capsídeos. A. Icosaédrica; B. Helicoidal. As unidades estruturais que compõem os capsídeos são mostradas à parte.

Assim, o capsídeo pode ser formado por cópias de uma mesma proteína (vírus do mosaico, rabdovírus) ou por diferentes tipos de proteínas (mais de dez tipos diferentes nos reovírus), e todas se encontram em múltiplas cópias e são codificadas pelo genoma viral. Os capsídeos compostos por cópias múltiplas de uma mesma proteína representam um exemplo de eficiência estrutural de armazenamento e economia de espaço no genoma, pois um único gene codifica a proteína necessária para formar todo o envoltório viral. Independente do número de proteínas que compõem o capsídeo, a associação entre essas proteínas pode resultar em capsídeos com duas simetrias principais: *icosaédrica* e *helicoidal* (Figura 1.5).

O *icosaedro* se constitui em uma estrutura quase esférica com uma cavidade interna. Os capsídeos icosaédricos (também denominados cúbicos) são formados pela associação de 20 unidades triangulares planas idênticas, unidas entre si em 12 vértices e arranjadas ao redor de uma esfera imaginária (Figura 1.6). Eixos imaginários traçados através do icosaedro dão origem a três possíveis planos de simetria: bilateral (*two-fold*), trilateral (*three-fold*) e pentalateral (*five-fold*). O número de unidades que compõem cada unidade triangular é variável e dá origem a variações estruturais entre os capsídeos de diferentes vírus. O icosaedro representa a otimização estrutural para a construção de um envoltório resistente, compacto e com máxima capacidade de armazenamento, podendo ser composto por múltiplas cópias de uma mesma proteína.

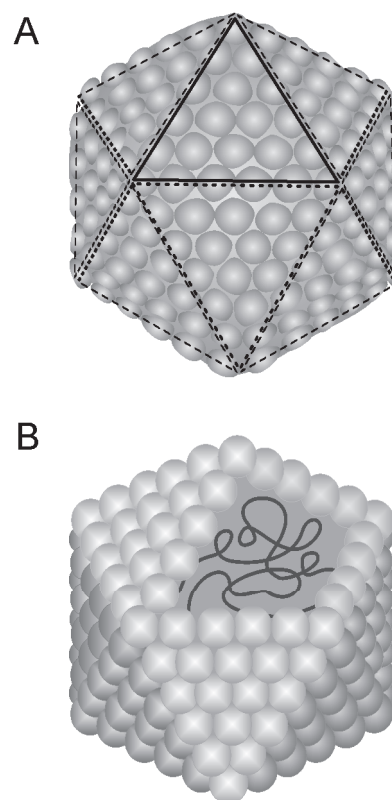


Figura 1.6. Ilustração esquemática de capsídeos icosaédricos. A. Superfície externa mostrando as unidades estruturais arranjadas em faces triangulares. B. Abertura mostrando o genoma no interior.

Os capsídeos helicoidais são formados por múltiplas cópias de uma mesma proteína. Essas proteínas se associam entre si e com o ácido nucleico, revestindo externamente o genoma. Essa associação resulta em uma estrutura espiralada alongada, flexível ou relativamente rígida (Figura 1.7). As dimensões dos nucleocapsídeos helicoidais variam muito, dependendo da extensão do genoma, podendo atingir até 1.800 nm nos filovírus.

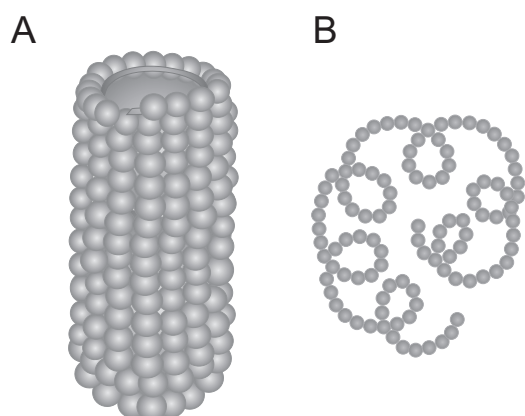


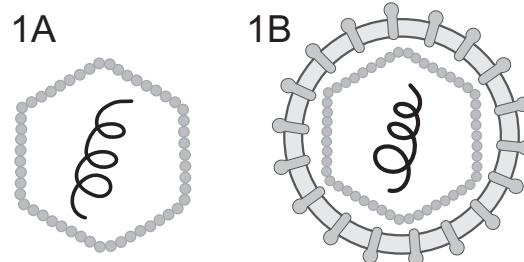
Figura 1.7. Ilustração esquemática de nucleocapsídeos helicoidais. A. Nucleocapsídeo helicoidal com morfologia definida; B. Nucleocapsídeo helicoidal flexível.

Os capsídeos helicoidais de alguns vírus de plantas apresentam-se como cilindros flexíveis ou rígidos, no interior do qual está localizado o genoma. São todos vírus sem envelope. Os vírus animais que possuem nucleocapsídeos helicoidais possuem genoma RNA de sentido negativo e são todos envelopados. O nucleocapsídeo helicoidal desses vírus é formado pela associação de cópias múltiplas da proteína do capsídeo com o genoma, que adota uma forma espiralada. Nos rabdovírus, o nucleocapsídeo adota uma forma bem definida, semelhante a um projétil de arma de fogo, no interior do qual se aloja o genoma espiralado (Figura 1.7A). Na maioria dos vírus, o nucleocapsídeo helicoidal é flexível e enovela-se sobre si mesmo e sobre o genoma sem adotar uma forma definida (Figura 1.7 B).

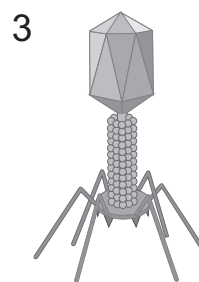
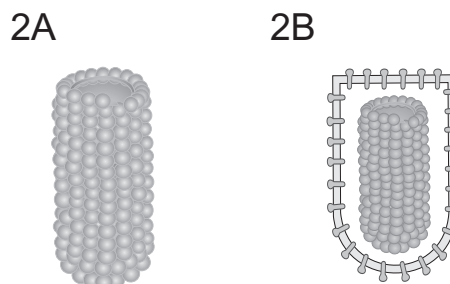
A maioria dos vírus animais possui capsídeos icosaédricos ou helicoidais, mas alguns (poxvírus, iridovírus e bacteriófagos) possuem capsídeos com arquitetura mais complexa, denominados genericamente capsídeos complexos.

Com base na arquitetura, simetria e complexidade de arquitetura, os vírions de diferentes famílias podem ser agrupados em cinco grupos estruturais (Figura 1.8):

1. Capsídeo icosaédrico



2. Capsídeo helicoidal



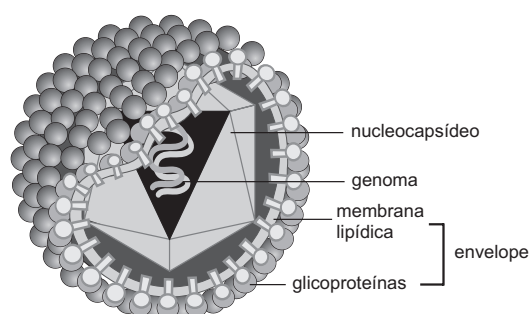
Fonte: adaptada de Carter et al. (2005).

Figura 1.8. Os cinco principais tipos estruturais dos vírus. 1. Vírions com capsídeos icosaédricos: 1A. Sem envelope; 1B. Com envelope. 2. Vírions com capsídeos helicoidais: 2A. Sem envelope; 2B. Com envelope. 3. Vírion com simetria complexa.

- sem envelope, capsídeo icosaédrico: ex: adenovírus, picornavírus;
- sem envelope, capsídeo helicoidal: ex: vírus do mosaico do tabaco;
- com envelope, capsídeo isosaédrico: ex: togavírus, herpesvírus;
- com envelope, capsídeo helicoidal: ex: parainfluenzavírus, rabdovírus;
- complexos: ex: bacteriófagos, poxvírus.

2.3 O envelope

Os vírions de várias famílias possuem os nucleocapsídeos recobertos externamente por uma membrana lipoprotéica denominada envelope. O envelope é formado por uma camada lipídica dupla, derivada de membranas celulares. Nessas membranas estão inseridas um número variável de proteínas codificadas pelo genoma viral. Na maioria dos vírus, o envelope está justaposto externamente ao capsídeo. Nos herpesvírus, entretanto, existe um espaço de espessura variável entre o capsídeo e o envelope, que é preenchido por uma substância protéica amorfa, denominada *tegumento*. A quantidade e a forma adotada pelo tegumento são variáveis e, conseqüentemente, determinam a variação da morfologia e dimensões da partícula dos herpesvírus. Como o envelope é derivado de membranas celulares, e estas são fluidas e flexíveis, a superfície externa e a morfologia dos vírus envelopados são mais flexíveis e menos definidas do que nos vírus sem envelope. A estrutura de um vírion com envelope está ilustrada na Figura 1.9.



Adaptado de Reschke, M.; www.biographix.de

Figura 1.9. Ilustração esquemática da estrutura de um vírion com envelope. As aberturas no envelope e no capsídeo são meramente ilustrativas, com o fim de permitir a visualização das estruturas internas.

Os vírions adquirem a membrana lipídica que compõe o envelope pela inserção/protusão do nucleocapsídeo através de membranas celulares, mecanismo denominado brotamento. Os lipídios que constituem o envelope são derivados das membranas da célula hospedeira, e as proteínas são codificadas pelo genoma viral. A estrutura lipídica dupla dos envelopes é bem semelhante entre os diferentes vírus. No entanto, a espessura e composição dessa camada variam de acordo com a membrana celular que os originou. O envelope, adquirido na membrana plasmática, contém fosfolipídios e colesterol em determinada proporção, enquanto o envelope originado das membranas celulares internas é mais delgado e contém pouco ou nenhum colesterol. Os envelopes virais praticamente não contêm proteínas celulares. As proteínas celulares da membrana são excluídas da região do brotamento por interações entre as proteínas virais que se inserem na camada lipídica.

Os envelopes dos vírus podem conter um ou mais tipos de proteínas codificadas pelo genoma viral (os herpesvírus possuem entre 10 e 12; os poxvírus possuem um número ainda maior). A maioria das proteínas do envelope contém oligosacarídeos (açúcares) associados, constituindo-se, portanto, em glicoproteínas. Essas glicoproteínas são produzidas e modificadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) e no aparelho de Golgi, ficando inseridas na própria membrana do RER ou sendo enviadas para a membrana nuclear do Golgi ou para a membrana plasmática, locais do brotamento.

As glicoproteínas do envelope viral possuem dimensões e estruturas variáveis e a maioria é formada por *proteínas integrais de membrana* (Figura 1.10A). Essas glicoproteínas podem estar presentes na forma de monômeros, homo ou heterodímeros, trímeros e até tetrâmeros. Em geral, as glicoproteínas do envelope apresentam três regiões principais em comum: a) uma região citoplasmática ou interna (cauda); b) uma região transmembrana (*tm*) e c) uma região externa. A cauda é geralmente pequena e interage com a superfície externa do nucleocapsídeo no processo de morfogênese e brotamento. A região *tm* está inserida na camada lipídica e serve de sustentação e fixação da proteína. A extensão dessa re-

gião varia de acordo com a espessura e origem da camada lipídica: entre 18 (vírus da febre amarela, que brota no retículo endoplasmático) e 26 aminoácidos (vírus da influenza, que adquire o envelope na membrana plasmática). A região *tm* é composta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Algumas glicoproteínas do envelope possuem várias regiões *tm* e, assim, atravessam a membrana duas ou três vezes. Outras não possuem região *tm* e, portanto, não se encontram inseridas na membrana lipídica. Essas glicoproteínas encontram-se associadas ao envelope por interações covalentes ou não-covalentes com outras glicoproteínas integrais de membrana e, por isso, são ditas *proteínas periféricas de membrana* (Figura 1.10B). Exemplos desse tipo de proteína são as glicoproteínas E0 dos pestivírus e a SU dos retrovírus. A região externa é geralmente maior; é hidrofílica e contém um número variável de oligossacarídeos associados. As glicoproteínas do envelope de alguns vírus formam projeções na superfície dos vírions, denominadas *peplômeros*, que podem ser visualizadas sob ME.

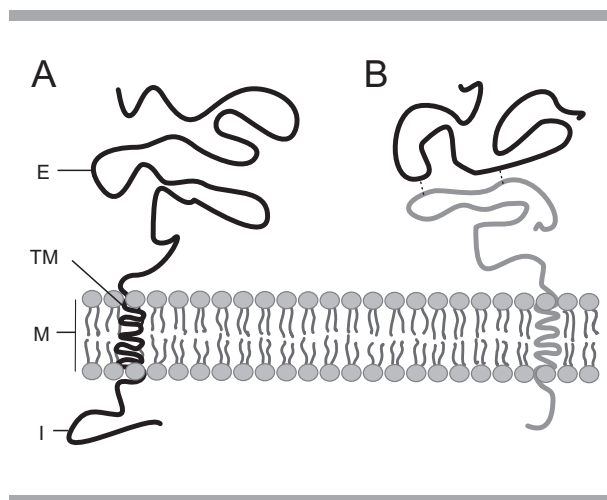


Figura 1.10. Representação simplificada da estrutura das glicoproteínas do envelope viral. A. Proteína integral de membrana com as regiões interna (I), transmembrana (TM) e externa (E); M. membrana lipídica; B. Duas proteínas associadas: uma integral de membrana (cinza) associada com uma proteína periférica (preto).

As glicoproteínas, principalmente por meio de sua região extracelular, desempenham várias funções na biologia do vírus, incluindo: a) ligação aos receptores celulares; b) fusão do envelope com a membrana celular; c) penetração celular e

d) transmissão do vírus entre células. Nas etapas finais do ciclo replicativo, algumas glicoproteínas do envelope auxiliam no egresso das partículas recém-formadas, permitindo a sua liberação a partir da membrana celular (neuraminidase nos ortomixovírus). As glicoproteínas do envelope também desempenham um importante papel na interação do vírus com o sistema imunológico e se constituem em alvos importantes para anticorpos neutralizantes.

Como as glicoproteínas do envelope mediam as interações iniciais dos vírions com as células, a sua integridade e conformação natural são essenciais para a infectividade do vírus. Algumas substâncias químicas (formalina e detergentes) ou agentes físicos (calor e radiações) alteram a conformação dessas proteínas e, conseqüentemente, reduzem ou eliminam a infectividade do vírus. Solventes lipídicos, como éter e clorofórmio, também afetam negativamente a infectividade de vírus envelopados, pois destroem a integridade da camada lipídica que compõe o envelope.

Os vírions adquirem o envelope por meio de um mecanismo denominado genericamente de *brotamento*. Nesse processo, o nucleocapsídeo inicialmente interage com as caudas das glicoproteínas previamente inseridas na membrana. Essa interação inicial é seguida da protusão/inserção do nucleocapsídeo através da membrana, resultando na formação de vírions com uma camada lipoprotéica que envolve externamente o nucleocapsídeo (Figura 1.11). O local do brotamento varia entre os diferentes vírus e pode ocorrer na membrana nuclear, do RER, do aparelho de Golgi ou na membrana plasmática.

2.4 A matriz

Alguns vírus envelopados possuem proteínas que recobrem externamente o nucleocapsídeo, mediando a sua associação com a superfície interna do envelope. Essas proteínas, denominadas de *matriz*, são geralmente glicosiladas e abundantes, podendo corresponder a até 30% da massa total dos vírions (como nos retrovírus). As proteínas da matriz são encontradas em vários vírus envelopados, principalmente nos vírus RNA de polaridade negativa (exemplos: parami-

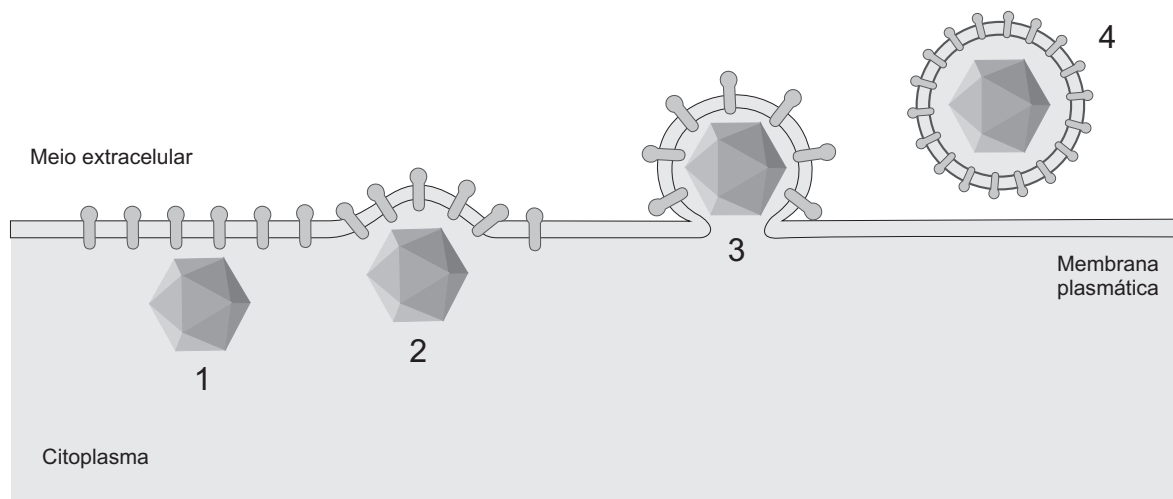


Figura 1.11. Etapas do brotamento e aquisição do envelope por vírus envelopados. 1. Interação do nucleocapsídeo com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas do envelope; 2-3. Inserção/protusão do nucleocapsídeo através da membrana; 4. Egresso da partícula completa.

xovírus e ortomixovírus). As proteínas da matriz desempenham importante função estrutural e na morfogênese das partículas víricas, pois interagem simultaneamente com a superfície externa do nucleocapsídeo e com as caudas das glicoproteínas, funcionando como adaptadores entre o nucleocapsídeo e o envelope.

3 Proteínas virais

O genoma dos vírus codifica duas classes principais de proteínas: estruturais e não-estruturais. As *proteínas estruturais* são aquelas que participam da construção e arquitetura da partícula vírica (Figura 1.12), ou seja, estão presentes como componentes estruturais dos vírions. Enquadram-se nessa classe as proteínas do nucleocapsídeo e do envelope. As proteínas do tegumento (herpesvírus) e as proteínas da matriz também se constituem em proteínas estruturais.

As *proteínas não-estruturais* são aquelas codificadas pelo genoma viral e produzidas no interior da célula hospedeira durante o ciclo replicativo, mas que não participam da estrutura das partículas víricas. São geralmente proteínas com atividades enzimáticas e/ou regulatórias que participam das diversas etapas do ciclo replicativo do vírus e de sua interação com as organelas e macromoléculas da célula hospedeira.

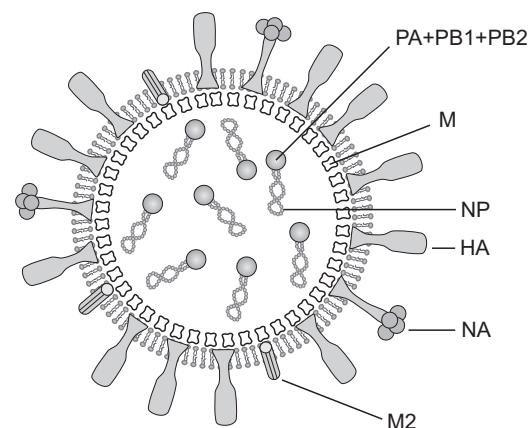


Figura 1.12. Ilustração esquemática da estrutura de um ortomixovírus (vírus da influenza), indicando a localização das proteínas na partícula vírica. Glicoproteínas do envelope: HA: hemaglutinina; NA: neuraminidase; M2: canal de íons; M: proteína da matriz. Componentes do complexo ribonucleoproteína: RNA: recoberto pela NP; NP: nucleoproteína; PA: polimerase ácida; PB1: polimerase básica 1; PB2: polimerase básica 2.

São exemplos de proteínas não-estruturais as enzimas polimerases de DNA (DNA polimerase) e RNA (RNA polimerase), enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos (timidina quinase, ribonucleotídeo redutase etc.), fatores de transcrição e regulação da expressão gênica (ICP0 nos herpesvírus, proteína E1A dos adenovírus,

antígeno T dos poliomavírus), entre outras. O número de proteínas não-estruturais (e também estruturais) codificadas pelo genoma varia com a complexidade dos vírus. Os vírus mais simples codificam uma ou poucas proteínas não-estruturais, enquanto os poxvírus e herpesvírus codificam dezenas de proteínas com atividades enzimáticas e regulatórias, que desempenham funções diversas no seu ciclo replicativo. Embora estejam presentes nas partículas víricas de várias famílias, proteínas com atividade enzimática são consideradas proteínas não-estruturais.

4 Outros componentes dos vírions

4.1 Enzimas

Proteínas com atividade enzimática estão presentes nas partículas víricas de membros de várias famílias de vírus DNA e RNA. Essas enzimas são necessárias para a síntese do ácido nucleico viral e/ou para a biossíntese de nucleotídeos e, geralmente, catalisam reações únicas dos vírus, que não encontram fatores com funções similares nas células hospedeiras. Os vírus RNA de sentido negativo, por exemplo, trazem a enzima RNA polimerase (polimerase de RNA dependente de RNA) nos vírions. Os retrovírus trazem, nos vírions, a enzima *transcriptase reversa* (polimerase de DNA dependente de RNA; também polimerase de DNA dependente de DNA). Os hepadnavírus também trazem a enzima polimerase (polimerase de DNA dependente de DNA e também de RNA) nos vírions. Os poxvírus trazem, em seus vírions, enzimas RNA polimerases (com atividade equivalente às do hospedeiro), além de enzimas que modificam o mRNA. Essas enzimas são necessárias para a realização dessas funções no citoplasma, onde ocorre a replicação viral. *Endonucleases* (ortomixovírus), *proteases* (vários vírus), *quinases* (hepadnavírus), *integrases* e *ribonucleases* (retrovírus) são exemplos de atividades enzimáticas presentes em partículas virais. Os retrovírus complexos (exemplo: vírus da imunodeficiência humana – HIV) possuem proteínas adicionais nos vírions, VPR e VIF, que são importantes para a replicação eficiente em alguns tipos de células.

4.2 Outras proteínas

Proteínas sem atividade enzimática, mas que possuem participação no ciclo replicativo, também estão presentes nos vírions de algumas famílias. Os herpesvírus possuem, como parte do tegumento, a VP-16 (ou α -TIF), que é um *transativador* dos genes iniciais, e a VHS, uma proteína que degrada os mRNA da célula hospedeira.

4.3 Lipídios

Os lipídios presentes nos envelopes virais são tipicamente os mesmos das membranas celulares, onde os vírions adquirem o seu envoltório externo. Os envelopes originados da membrana plasmática contêm principalmente fosfolipídios (50-70%) e colesterol, enquanto os envelopes adquiridos em membranas celulares internas (nuclear, Golgi, RER) possuem pouco ou nenhum colesterol. Os lipídios constituem entre 20 e 35% da massa dos vírus envelopados.

4.4 Carboidratos

Os carboidratos podem estar presentes em vírions como componentes de glicoproteínas, glicolipídios e mucopolissacarídeos. Esses carboidratos estão presentes principalmente no envelope, mas os vírus complexos (poxvírus) também possuem carboidratos associados com proteínas internas e/ou do capsídeo.

4.5 Ácidos nucleicos celulares

Alguns vírus podem ocasionalmente encapsidar em seus vírions, fragmentos de DNA cromossômico da célula hospedeira (poliomavírus). Os vírions dos retrovírus contêm moléculas de RNA transportador (tRNA) adquiridos da célula infectada. Esse tRNA desempenha um papel importante no início do ciclo replicativo do vírus, pois serve de iniciador (*primer*) para a síntese da cadeia de DNA a partir do RNA genômico viral. Os vírions da família *Arenaviridae* contêm ribossomos da célula hospedeira, o que lhes confere uma aparência granular quando examinados sob

ME (daí a denominação da família, *arena* = areia). Os vírions dos ortomixovírus podem conter RNA ribossômico derivado das células hospedeiras.

4.6 Proteínas celulares

No núcleo da célula hospedeira, o genoma DNA recém-replicado dos poliomavírus e papilomavírus associa-se com proteínas celulares denominadas histonas (H), formando estruturas semelhantes à cromatina celular. Essas estruturas, chamadas de minicromossomas, que contêm o DNA viral, conjugado com as histonas H2A, H2B, H3 e H4, são encapsidadas durante a morfogênese das partículas virais. Cabe ressaltar que cada vírion dos papilomavírus e poliomavírus contém uma cópia do genoma, ou seja, um minicromossoma. Os vírions dessas famílias, portanto, contêm certa quantidade de proteínas celulares.

5 Partículas víricas anômalas

Além de partículas víricas completas e infectivas, a replicação de alguns vírus pode resultar na produção de uma quantidade variável de partículas víricas anômalas, geralmente não-infecciosas. A frequência e abundância dessas partículas em relação aos vírions completos e infecciosos variam amplamente de acordo com o vírus. São muitas as causas da ausência de infectividade nessas partículas, incluindo:

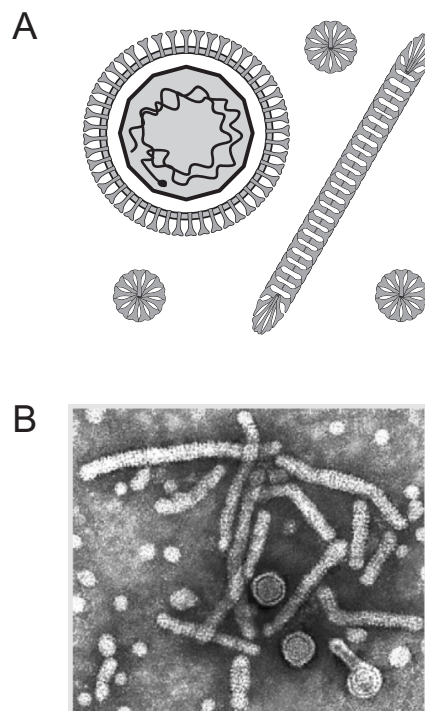
- ausência do genoma viral. Células infectadas por *poliomavírus* podem produzir capsídeos vazios, sem o DNA genômico; outros capsídeos podem conter fragmentos de DNA celular. Essas partículas são denominadas *pseudovírions*;

- células infectadas por vírus de genoma RNA segmentado (ortomixovírus, por exemplo) podem produzir vírions com o conjunto incompleto dos segmentos genômicos;

- vários vírus podem encapsidar genomas com deleções em um ou mais genes. Os vírions que contêm esses genomas defectivos são denominados partículas defectivas. Esses vírions não replicam autonomamente e somente são capazes de replicar quando ocorre uma co-infecção com um vírus homólogo infeccioso (denominado de *vírus helper*);

- os picornavírus podem ocasionalmente apresentar capsídeos vazios em razão da degradação do genoma;

- células infectadas com os hepadnavírus (vírus da hepatite B) produzem vírions completos (*Dane particles*) e também duas formas de partículas incompletas (partículas esféricas de 20 nm e partículas filamentosas) (Figura 1.13). As partículas incompletas são formadas por moléculas da glicoproteína de superfície (HbsAg), associadas com segmentos de membranas celulares. Para cada vírion completo, são produzidas entre 10.000 e 1.000.000 partículas esféricas. A abundância dessas partículas no sangue de pessoas infectadas cronicamente tem sido utilizada como ferramenta para o diagnóstico e, durante muitos anos, foi utilizada para a produção de vacinas.



A. Fonte: adaptada de Flint et al. (2000).

B. Fonte: Dr. Linda Stannard, www.uct.ac.za.

Figura 1.13. Partículas produzidas por células infectadas pelo vírus da hepatite B (hepadnavírus). A. Ilustração esquemática e B. fotografia de microscopia eletrônica. As partículas esféricas maiores com parede dupla são as partículas infecciosas (*dane particles*); as esféricas menores e as filamentosas são partículas defectivas, compostas por proteínas de superfície e porções de membranas celulares.

6 Propriedades físico-químicas

Vários agentes físicos e químicos podem afetar a integridade funcional e infectividade dos vírions, incluindo a temperatura e o pH. A ação deletéria da temperatura sobre a viabilidade dos vírus possui importância durante a manipulação e remessa de material clínico para o diagnóstico, como também para a preservação de estoques virais na rotina laboratorial. Além disso, pode ser um fator limitante para a sua disseminação entre hospedeiros. Temperaturas de 55 a 60°C desnaturam as proteínas de superfície, sobretudo as do envelope, em poucos minutos, tornando os vírions incapazes de interagir produtivamente com receptores celulares e iniciar a infecção. Temperaturas ambientais altas também afetam negativamente a infectividade dos vírus.

Os vírus envelopados são geralmente muito mais sensíveis à ação deletéria de altas temperaturas sobre a infectividade. Alguns vírus, como os paramixovírus, são particularmente susceptíveis a temperaturas ambientais e também perdem a infectividade quando submetidos a congelamento e descongelamento. A conservação de vírus em suspensão líquida por longos períodos deve ser realizada a temperaturas de -70°C ou em nitrogênio líquido (-196°C). Outra forma segura e eficiente de armazenar vírus por longos períodos sem perder infectividade é por meio de liofilização (dessecação a temperaturas de congelamento) e conservação do material liofilizado (pó) a 4°C ou -20°C.

Para vírus em suspensão, temperaturas de 4 a 6°C são compatíveis com a preservação da infectividade apenas por horas ou poucos dias; temperaturas de 4° ou -20°C não são indicadas para conservação por longos períodos. A resistência a diferentes condições de pH varia amplamente; alguns vírus sem envelope (rotavírus, alguns picornavírus) mantêm a infectividade mesmo em condições de pH ácido e são chamados de ácido-resistentes; outros, sobretudo os envelopados, são inativados já em pH um pouco abaixo do neutro (5 a 6) e são chamados de ácido-lábeis. Agentes químicos que possuem ação desnaturante sobre proteínas e/ou solventes e detergentes lipídicos possuem ação deletéria sobre a infectividade dos

vírus e muitos são utilizados como desinfetantes de materiais, equipamentos e ambientes. Em geral, os vírus sem envelope são muito mais resistentes a agentes químicos e condições ambientais do que os vírus com envelope.

7 Bibliografia consultada

BAKER, T.S.; JOHNSON, J.E. Principles of virus structure determination. In: CHIU, W.; BURNETT, R.M.; GARCEA, R.L. (ed). **Structural biology of viruses**. New York, NY: Oxford University Press, 1997. p.38-79.

CANN, A.J. **Principles of molecular virology**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1997. 310p.

CASPAR, D.L.D.; KLUG, A. Physical principles in the construction of regular viruses. **Cold spring harbor symposium on quantitative biology**, v.27, p.1-24, 1962.

CHAPMAN, M.S.; GIRANDA, V.L.; ROSSMANN, M.G. The structures of human rhinovirus and mengo virus: relevance to function and drug design. **Seminars in virology**, v.1, p.413-427, 1990.

DULBECCO, R.; GINSBERG, H.S. **Microbiologia de Davis: virologia**. 2. ed. São Paulo: Harbra, 1980. v.4, 1763p.

FLINT, S.J. et al. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. 804p.

GARCEA, R.L.; LIDDINGTON, R.C. Structural biology of polyomaviruses. In: CHIU, W.; BURNETT, R.M.; GARCEA, R.L. (eds). **Structural biology of viruses**. New York, NY: Oxford University Press, 1997. p.157-187.

HARRISON, S.C. Principles of virus structure. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.3, p.53-85.

HUNTER, E. Virus assembly. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.8, p.171-197.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.

MURRAY, P.R. et al. **Medical microbiology**. 2. ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1994, p.573.

QUINN, P.J. et al. **Clinical microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648p.

RIXON, F.J. Structure and assembly of herpesviruses. **Seminars in virology**, v.4, p.135-144, 1993.

ROSSMANN, M.G. et al. Structure of a human cold virus and structural relationship to other picornaviruses. **Nature**, v.317, p.145-153, 1985.

RYAN, K.J. **Sherris medical microbiology**: an introduction to infectious diseases. 3. ed. Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1994. 890 p.

STEWART, P.L.; BURNETT, R.M. The structure of adenovirus. **Seminars in virology**, v.1, p.477-487, 1990.

WHITE, D.O.; FENNER, F. **Medical virology**. 4. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1994. 603 p.

WILSON, J.A.T.; SKEHEL, T.S.; WILEY, D.C. Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A resolution. **Nature**, v.289, p.366-373, 1981.

WIMMER, E. **Cellular receptors for animal viruses**. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 526p.

WISE, D.J.; CARTER, G.R.; FLORES, E.F. General characteristics, structure and taxonomy of viruses. In: CARTER, G.R., WISE, D. J.; FLORES, E.F. (Eds.). **A concise review of veterinary virology**. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 20 set. 2006.

Anexos

Tabela 1.1. Características morfológico-estruturais dos vírions e do genoma dos vírus DNA


























	Família	Capsídeo	Envelope	Dimensões e morfologia do vírions	Características do genoma
FITA SIMPLES	 <i>Circoviridae</i>	Icosaédrico	Não	15-22 nm, esférico-icosaédricos	DNA de cadeia simples, circular, 1.7-2,2kb
	 <i>Parvoviridae</i>	Icosaédrico	Não	25nm, icosaédricos	DNA de cadeia simples, linear, seqüências complementares nas extremidades, flexionadas sobre si (hairpins), ± 5 kb
FITA DUPLA	 <i>Polyomaviridae</i>	Icosaédrico	Não	45nm, esférico-icosaédricos	DNA de cadeia dupla, circular, superenrolada, ± 5 kb
	 <i>Papillomaviridae</i>	Icosaédrico	Não	55nm, esférico-icosaédricos	DNA de cadeia dupla, circular, superenrolada, ± 8 kb
	 <i>Adenoviridae</i>	Icosaédrico	Não	80-110nm, icosaédricos	DNA de cadeia dupla, linear, com uma proteína nas extremidades, 30-44 kb
	 <i>Herpesviridae</i>	Icosaédrico	Sim	120-200 nm, pleomórficos ou aproximadamente esféricos	DNA de cadeia dupla, linear, 120-235 kb
	 <i>Poxviridae</i>	Complexo	Sim	170- 200 x 300-450nm, ovóides/retangulares	DNA de cadeia dupla, linear e contínua, 130-375 kb
	 <i>Iridoviridae/Asfaviridae</i>	Complexo	Sim	175-215nm, quase esféricos ou com aspecto de prismas hexagonais	DNA de cadeia dupla, linear e contínua, 170-190kb
	 <i>Hepadnaviridae</i>	Icosaédrico	Sim	40-48nm, esféricos, ocasionalmente pleomórficos, partículas subvirais em excesso	DNA de cadeia parcialmente dupla (3/4), com as extremidades pareando entre si (pseudo-circular), 3.2 kb

Tabela 1.2. Características morfológico-estruturais dos vírions e do genoma dos vírus RNA

		Família	Capsídeo	Envelope	Dimensões e morfologia do vírions	Características do genoma
FITA SIMPLES	POLARIDADE POSITIVA	 <i>Retroviridae</i>	Icosaédrico	Sim	80-100nm, esféricos	duas cópias idênticas de RNA, cadeia simples (+), linear, 7-11kb
		 <i>Picornaviridae</i>	Icosaédrico	Não	28-30nm, esférico-icosaédricos	RNA de cadeia simples (+), linear, 5'IRES, 3'polyA, 7.2 - 8.5kb
		 <i>Caliciviridae</i>	Icosaédrico	Não	30-38nm, esférico-icosaédricos	RNA de cadeia simples (+), linear, proteína na ext. 5', 3'polyA, 7.4 -7.7kb
		 <i>Astroviridae</i>	Icosaédrico	Não	28-30nm, esféricos	RNA de cadeia simples (+), linear, 3'polyA, 7.2-7.9kb
		 <i>Coronaviridae</i>	Helicoidal	Sim	80-220nm, pleomórficos ou aproximadamente esféricos	RNA de cadeia simples (+), linear, 5'cap, 3'polyA, 20-32kb
		 <i>Arteriviridae</i>	Icosaédrico	Sim	50-70nm, aproximadamente esféricos	RNA de cadeia simples (+), linear, 5'cap, 3' polyA, 15kb
		 <i>Togaviridae</i>	Icosaédrico	Sim	70nm, esféricos	RNA de cadeia simples (+), linear, 5'cap, 3'polyA, 9.7-11.8kb
		 <i>Flaviviridae</i>	Icosaédrico	Sim	45-60nm, esférico	RNA de cadeia simples (+), linear, 5'cap/IRES, 3'polyA/poliC, 9.5-12.5kb
	POLARIDADE NEGATIVA	 <i>Paramyxoviridae</i>	Helicoidal	Sim	150-300nm, pleomórficos, aproximadamente esféricos, filamentosos	RNA de cadeia simples (-), linear, 15-16kb
		 <i>Rhabdoviridae</i>	Helicoidal	Sim	70-85 x 130-380 nm, forma de projétil	RNA de cadeia simples (-), linear, 13-16kb
		 <i>Filoviridae</i>	Helicoidal	Sim	80 x 780-970nm (até 14.000), pleomórficos (filamentosos, forma de "U" ou "6")	RNA de cadeia simples (-), linear, 19.1kb
		? <i>Bornaviridae</i>	?	Sim	90nm, esféricos (?)	RNA de cadeia simples (-), linear, 8.9kb
		 <i>Orthomyxoviridae</i>	Helicoidal	Sim	80-120nm, ovóides, filamentosos, aproximadamente esféricos, pleomórficos	6 a 8 segmentos de RNA de cadeia simples, (-), lineares, extremidades complementares permitem circularização, 10-13.6kb
		 <i>Bunyaviridae</i>	Helicoidal	Sim	80-120nm, pleomórficos ou esféricos.	3 segmentos de RNA de cadeia simples (-), lineares, extremidades complementares permitem circularização, 11-21kb
		 <i>Arenaviridae</i>	Helicoidal	Sim	50 x 300nm , esféricos ou pleomórficos	2 segmentos de RNA de cadeia simples (-), lineares, 10-14kb
		 <i>Birnaviridae</i>	Icosaédrica	Não	60nm, icosaédricos	2 segmentos de RNA de cadeia dupla, lineares, 5.7-5.9kb
FITA DUPLA		 <i>Reoviridae</i>	Icosaédrica	Não	60-80nm, aproximadamente esféricos	10, 11 ou 12 segmentos de RNA de cadeia dupla, lineares, 16-27kb

CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DOS VÍRUS

Luciane Teresinha Lovato

2

1 Introdução	39
2 Taxonomia dos vírus	39
3 Nomenclatura dos vírus	41
4 Critérios utilizados para a classificação dos vírus	41
5 Famílias de vírus	42
5.1 Vírus com genoma DNA	42
5.1.1 <i>Poxviridae</i>	42
5.1.2 <i>Asfarviridae</i>	43
5.1.3 <i>Herpesviridae</i>	44
5.1.4 <i>Adenoviridae</i>	44
5.1.5 <i>Papillomaviridae</i>	45
5.1.6 <i>Polyomaviridae</i>	46
5.1.7 <i>Parvoviridae</i>	46
5.1.8 <i>Circoviridae</i>	47
5.1.9 <i>Hepadnaviridae</i>	47
5.2 Vírus com genoma RNA de sentido positivo	48
5.2.1 <i>Picornaviridae</i>	48
5.2.2 <i>Caliciviridae</i>	49
5.2.3 <i>Astroviridae</i>	49
5.2.4 <i>Togaviridae</i>	50
5.2.5 <i>Flaviviridae</i>	50
5.2.6 <i>Coronaviridae</i>	51
5.2.7 <i>Arteriviridae</i>	51
5.3 Vírus com genoma RNA de sentido negativo não-segmentado	52
5.3.1 <i>Paramyxoviridae</i>	52
5.3.2 <i>Rhabdoviridae</i>	52
5.3.3 <i>Filoviridae</i>	53
5.3.4 <i>Bornaviridae</i>	54

5.4 Vírus com genoma RNA de sentido negativo segmentado	54
5.4.1 <i>Orthomyxoviridae</i>	54
5.4.2 <i>Bunyaviridae</i>	54
5.4.3 <i>Arenaviridae</i>	55
 5.5 Vírus com genoma RNA de fita dupla	 56
5.5.1 <i>Reoviridae</i>	56
5.5.2 <i>Birnaviridae</i>	56
 5.6 Vírus com genoma RNA que realizam transcrição reversa	 57
5.6.1 <i>Retroviridae</i>	57
 6 Bibliografia consultada	 57

1 Introdução

Existe um número muito grande de vírus circulando nas diferentes espécies de seres vivos, desde vírus que infectam bactérias até aqueles que infectam organismos superiores, como os mamíferos e plantas. Dentre estes, existem vírus altamente patogênicos e outros que não causam doença nos seus hospedeiros, passando despercebidos. Atualmente, são reconhecidas mais de 1.500 espécies de vírus, que abrangem mais de 30.000 cepas, isoladas ou variantes.

A classificação e nomenclatura dos vírus não seguem as regras determinadas para os demais microorganismos. À medida que foram sendo identificados, os vírus foram sendo agrupados de forma aleatória, de acordo com os aspectos considerados mais importantes pelos grupos que os identificavam. Nas décadas de 1950 e 1960, houve um grande avanço na Virologia, resultando na identificação de um grande número de novos vírus. Com o intuito de determinar regras básicas para classificar esses vírus, vários comitês foram formados, o que acabou gerando uma grande confusão taxonômica.

Durante o Congresso Internacional de Microbiologia, realizado em Moscou, em 1966, foi criado o Comitê Internacional para Nomenclatura de Vírus (ICTV). Esse comitê teve a incumbência de desenvolver um sistema único de classificação e nomenclatura para todos os vírus. Até hoje, o ICTV é o órgão que determina as regras a serem seguidas para a classificação dos vírus até o nível de espécie. Esse comitê se reúne periodicamente, com o fim de revisar e atualizar os critérios de classificação, de modo que as novas descobertas biológicas e moleculares possam ser incorporadas aos critérios taxonômicos já existentes. Com isso, a classificação dos vírus nas diversas hierarquias tornou-se dinâmica e pode ser alterada à medida que novas informações biológicas ou moleculares assim o justifiquem. A classificação apresentada neste texto está de acordo com a última revisão do ICTV, datada de 07 de julho de 2007.

2 Taxonomia dos vírus

De acordo com os vários critérios adotados, os vírus são classificados hierarquicamente em ordens, famílias, subfamílias, gêneros e espécies. O sufixo *virales* é utilizado para designar a ordem. Para a denominação de família, utiliza-se o sufixo *viridae*; para subfamília, utiliza-se *virinae*; e para gênero, o sufixo *virus*. Por exemplo, o vírus da cinomose canina está classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Morbillivirus* e, finalmente, espécie, como vírus da cinomose canina (*canine distemper virus*, CDV). As famílias são os agrupamentos fundamentais dos vírus, agrupando agentes que possuem características estruturais, morfológicas, genéticas e biológicas em comum. Algumas famílias – a minoria – são agrupadas em níveis hierárquicos superiores: as ordens. Da mesma forma, nem todas as famílias são divididas em subfamílias; algumas delas apresentam o gênero como nível hierárquico imediatamente inferior, ou seja, nem todos os vírus são classificados em todos os níveis hierárquicos possíveis, possuindo complexidades de classificação diferentes entre si.

Os vírus que apresentam algumas características biológicas, estruturais e moleculares em comum são agrupados em uma mesma família. Por exemplo, todos os membros da família *Herpesviridae* possuem vírions grandes, com envelope contendo várias glicoproteínas, capsídeo icosaédrico, uma camada protéica – denominada tegumento – entre o capsídeo e o envelope. O genoma é composto por uma molécula de DNA de fita dupla linear. Esses vírus são capazes de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros. Os vírus que apresentam essas características (e que por isso compõem a família *Herpesviridae*) podem ser subdivididos em subfamílias, de acordo com algumas características que possuem em comum e que são diferentes dos outros vírus da família. Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem um amplo espectro de hospedeiros, apresentam um ciclo rápido e lítico em célu-

las de cultivo e estabelecem infecções latentes em neurônios sensoriais e autonômicos. Essas características diferem dos membros das outras subfamílias: *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*.

Os vírus de uma família ou de uma subfamília podem ser divididos em gêneros, de acordo com propriedades biológicas, e, principalmente, moleculares, como a estrutura e organização genômica: a subfamília *Alphaherpesvirinae* possui dois gêneros, o *Simplexvirus* e o *Varicellovirus*. Dentro de cada gênero se encontram as espécies, que são grupos de vírus muito semelhantes entre si (a exemplo de espécies de animais), mas que apresentam algumas diferenças que justificam a sua classificação como vírus diferentes (e também diferentes dos vírus do outro gênero). Por exemplo, no gênero *Varicellovirus*, encontram-se classificados os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), o herpesvírus suíno (SuHV-1) ou vírus da doença de Aujeszky (PRV), entre outros.

A classificação dos vírus em espécies não é consensual entre os virologistas. A definição de espécie aceita pelo ICTV foi estabelecida em 1991 e diz o seguinte: “espécie de vírus é uma classe ‘polythetic’¹ de vírus que constitui uma linhagem replicativa e ocupa um nicho ecológico particular”. Uma classe *polythetic* é definida em termos de um amplo grupo de critérios sendo que nenhum dos critérios isoladamente é necessário ou suficiente. Dessa forma, cada membro da classe deve possuir um número mínimo de características, mas nenhum dos aspectos necessita ser encontrado em todos os membros de uma classe. Assim, diferentes características podem ser usadas em diferentes grupos de vírus.

A classificação em subespécies, cepas, variantes e isolados não existe de forma oficial, embora seja reconhecida a sua importância para o diagnóstico, para estudos biológicos e moleculares e também para a produção de vacinas. A seguir são apresentadas algumas definições desses termos.

O termo *isolado* (ou amostra) refere-se a um vírus que foi obtido por isolamento de uma determinada fonte de infecção (animal infectado),

¹ A tradução para o termo “polythetic” não consta em dicionários oficiais; por esta razão o termo foi escrito na sua forma original e a definição colocada logo em seguida no texto.

por exemplo: o SV-299/04 é um BoHV-5 isolado do cérebro de um bovino que desenvolveu meningoencefalite no estado do Rio Grande do Sul. A denominação SV-299/04 foi dada pelo laboratório que realizou o isolamento do vírus e refere-se ao número do protocolo. Qualquer vírus que tenha sido isolado de material clínico e sobre o qual se conheça pouco, além de sua identidade, constitui-se em um isolado ou amostra.

O termo *cepa* é utilizado para designar amostras de vírus que já foram bem caracterizadas e sobre as quais já se possui certo conhecimento. A denominação *cepa* também pode ser utilizada para se referir a isolados de um vírus que podem apresentar pequenas variações sem deixar de pertencer às mesmas categorias taxonômicas. Por exemplo, o vírus da doença de Newcastle (NDV) pode apresentar diferentes níveis de virulência, dependendo da cepa do vírus que está causando a doença. Existem três cepas desse vírus em ordem crescente de virulência: as lentogênicas, as mesogênicas e as velogênicas. Assim, aqueles isolados do vírus que apresentam alta virulência pertencem à cepa velogênica, os que apresentam virulência moderada são mesogênicos, e os de baixa virulência são os lentogênicos.

Cepas de referência são cepas amplamente caracterizadas e reconhecidas nacional ou internacionalmente, que são utilizadas como referência para determinado vírus em testes de diagnóstico, pesquisa e para a produção de vacinas. Por exemplo, a cepa Cooper do BoHV-1 serve de referência para comparações de isolados desse vírus e é amplamente utilizada em diagnóstico e na produção de vacinas.

A terminologia *wild-type* refere-se à cepa original do vírus que circula na natureza. No caso da existência de mutantes, o *wild-type* é a cepa que deu origem aos mutantes. Em português, utilizam-se os termos *cepa de campo* (ou vírus de campo), no caso dos vírus circulantes na população; e *cepa original* ou *parental* no caso da produção e/ou comparação com mutantes. *Variantes* ou *mutantes* são vírus que diferem do *wild-type* em alguma característica fenotípica, como, por exemplo, o vírus da vacina contra a doença de Aujeszky é um mutante de deleção que foi produzido a partir da cepa Bartha do herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1).

3 Nomenclatura dos vírus

No uso formal, as palavras que designam as famílias, subfamílias e gêneros devem iniciar com letra maiúscula e devem ser escritas em itálico ou sublinhadas. O nome da espécie do vírus não deve iniciar com letra maiúscula (a não ser que este nome corresponda a um nome próprio de região, cidade etc.) e deve ser escrito com fonte normal, sem itálico. No uso formal, a hierarquia (táxon) deve preceder a unidade taxonômica. Exemplo: “a família *Parvoviridae*”; “o gênero *Parvovirus*”.

No uso informal (ou vernacular) os termos referentes à família, subfamília, gênero e espécie devem ser escritos com letras minúsculas, sem itálico ou sublinhado. Neste caso, o sufixo formal não é incluído e o nome do táxon segue o termo usado para definir a unidade taxonômica. Escreve-se então: “a família dos poxvírus”, “o gênero parapoxvirus”. O uso informal em português deve suprimir letras que não existam no alfabeto da língua portuguesa. Exemplo: para se referir de forma vernacular aos membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, deve-se escrever: “os alfa herpesvírus”. Os membros da família *Orthomyxoviridae* devem ser tratados como “os ortomixovírus”.

No uso informal, o nome do táxon é, muitas vezes, suprimido, o que pode resultar em confusões. Isto se deve à raiz comum das palavras utilizadas para definir as unidades taxonômicas nos diferentes níveis. Dessa forma, dependendo do contexto, a palavra flavivírus pode estar sendo usada para referir-se tanto à família *Flaviviridae* como ao gênero *Flavivirus*. Para evitar essa ambigüidade, aconselha-se o uso do táxon precedendo o termo usado. Exemplo: vírus do gênero *Flavivirus*.

A nomenclatura oficial dos vírus utiliza abreviaturas, que são constituídas pelas iniciais do nome da espécie viral. No presente texto, serão utilizadas as abreviaturas derivadas da nomenclatura na língua inglesa, por exemplo, herpesvírus bovino tipo 1 (do inglês *bovine herpesvirus type 1*, BoHV-1).

No uso informal, muitos vírus podem ser denominados de duas ou três formas diferentes,

de acordo com a sua denominação original e com a nomenclatura oficial preconizada pelo ICTV. As recomendações do ICTV são de que a sua nomenclatura substitua as anteriores, embora alguns deles continuem a ser denominados pela nomenclatura tradicional. Citam-se como exemplos o SuHV-1, que também é conhecido como vírus da doença de Aujeszky (ADV) ou vírus da pseudorraiva (PRV), e o BoHV-1, que é também conhecido como vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV).

Exemplos de nomenclatura de vírus:

a) Formal: família: *Picornaviridae*; gênero: *Aphtovirus*; espécie: vírus da febre aftosa (*foot and mouth disease virus*, FMDV);

Vernacular: “Os aftovírus são sensíveis ao pH baixo [...]”.

b) Formal: família: *Herpesviridae*, subfamília: *Alphaherpesvirinae*, gênero: *Alphaherpesvirus*, espécie: herpesvírus suíno tipo 1 (vírus da doença de Aujeszky);

Vernacular: “O vírus da doença de Aujeszky é um alfa herpesvírus [...]”.

c) Formal: ordem: *Mononegavirales*; família: *Paramyxoviridae*; subfamília: *Pneumovirinae*; gênero: *Pneumovirus*, espécie: vírus sincicial respiratório bovino (BRSV);

Vernacular: “Os pneumovírus causam doença respiratória [...]”.

d) Formal: família: *Flaviviridae*; gênero: *Flavivirus*; espécie: vírus da febre amarela (YFV);

Vernacular: “O vírus da febre amarela é um flavivírus transmitido por mosquitos”.

4 Critérios utilizados para a classificação dos vírus

A evolução nos métodos de detecção e caracterização dos vírus determinou uma evolução nos critérios utilizados para a sua classificação. A diferenciação entre vírus e os demais microorganismos foi o primeiro passo na classificação dos agentes virais e essa diferença foi determinada, inicialmente, pela filtrabilidade dos vírus. Enquanto as bactérias eram retidas no filtro, os vírus passavam por ele, surgindo a denominação de agentes filtráveis.

No início, as características ecológicas e de transmissão, sinais clínicos da doença e tropismo por determinado órgão ou tecido foram os critérios utilizados na classificação dos vírus. O desenvolvimento da microscopia eletrônica possibilitou a classificação de acordo com a morfologia das partículas virais. Ao longo dessa evolução, outras características foram sendo mais conhecidas e consideradas para descrever os vírus. Aspectos como a composição química, o tipo de genoma, distribuição geográfica, vetores, estabilidade e antigenicidade dos vírus foram adquirindo importância. Atualmente as técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para refinar e detalhar a classificação dos vírus, especialmente o sequenciamento e comparação entre sequências do genoma. Estratégias de expressão gênica, homologia de nucleotídeos entre sequências correspondentes, estrutura e funções de proteínas virais também foram incorporadas aos critérios de classificação dos vírus.

De acordo com o ICTV, as seguintes características são atualmente levadas em consideração para classificar os vírus em ordem, famílias, subfamílias e gêneros: tipo de ácido nucléico e organização do genoma, estratégia de replicação e estrutura do vírion.

A classificação em espécies, embora não regulamentada pelo ICTV, segue os seguintes critérios:

- a) homologia da sequência do genoma;
- b) hospedeiros naturais;
- c) tropismo de tecido e células;
- d) patogenicidade e citopatologia;
- e) forma de transmissão;
- f) propriedades físico-químicas;
- g) propriedades antigênicas.

Uma outra classificação prática, não oficial, é regularmente usada entre os virologistas. Nesse caso, são levados em consideração os critérios epidemiológicos e/ou clínico-patológicos para agrupar os vírus. De acordo com esse critério, os vírus são classificados em:

a) respiratórios: vírus que penetram no hospedeiro por inalação e produzem infecção e doença primariamente no trato respiratório. Ex: rinovírus, calicivírus;

b) entéricos: vírus que penetram pela via oral e replicam no trato intestinal. Ex: coronavírus, rotavírus;

c) arbovírus: vírus que replicam e são transmitidos por vetores artrópodos. Ex: vírus da encefalite equina leste e oeste;

d) vírus oncogênicos: vírus com potencial para induzir transformação celular e tumores nos hospedeiros. Ex: retrovírus, papilomavírus.

5 Famílias de vírus

A seguir serão apresentadas as famílias de vírus que contêm patógenos de animais (Figuras 2.1 a 2.25). Em cada gênero, serão mencionados os principais vírus que causam doenças em animais de interesse para a medicina veterinária, ou seja, animais de produção e animais de companhia. Também serão citados os principais patógenos humanos. Cabe ressaltar, por essa razão, que esta lista não se constitui na relação completa dos vírus de cada família.

5.1 Vírus com genoma DNA

5.1.1 Família: *Poxviridae*

Subfamília: *Chordopoxvirinae* (infectam vertebrados)

Gêneros:

– *Orthopoxvirus*: vírus da *vaccinia* (VACV), poxvírus bovino (varíola bovina), vírus da ectromelia (camundongos);

– *Parapoxvirus*: vírus do ectima contagioso dos ovinos (ORFV), vírus da estomatite papular bovina (BPSV);

– *Avipoxvirus*: vírus da bouba aviária (FWPV), poxvírus do canário (CNPV);

– *Capripoxvirus*: poxvírus dos caprinos (GTPV), poxvírus dos ovinos (SPPV), vírus da doença Lumpy Skin (LSDV);

– *Leporipoxvirus*: vírus do mixoma de coelhos (MYXV), vírus do fibroma de coelhos (RFV);

– *Suipoxvirus*: poxvírus suíno (SWPV);

– *Molluscipoxvirus*: vírus do molusco contagioso (MOCV);

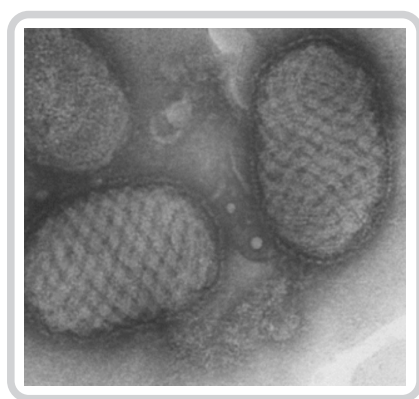
– *Yatapoxvirus*: vírus Tanapox (TANV) e Yatapox dos macacos (YMTV).

Subfamília: *Entomopoxvirinae* (infectam insetos)

Gêneros:

- *Alphaentomopoxvirus*;
- *Betaentomopoxvirus*;
- *Gammaentomopoxvirus*.

Os poxvírus são os maiores vírus de animais. Os vírions possuem uma forma retangular ou ovóide, com simetria complexa e, geralmente, possuem envelope lipídico (algumas partículas podem não possuir). As dimensões das partículas virais podem variar de 220 a 450 nm de extensão x 140 a 260 nm de largura x 140 a 260 nm de espessura. O genoma consiste de uma única molécula de DNA, linear, cadeia dupla, com 130 a 375 kbp. Esses vírus trazem, nos vírions, um número considerável de enzimas e fatores auxiliares; e realizam o ciclo replicativo inteiramente no citoplasma das células hospedeiras. A maioria das doenças produzidas por esses vírus caracteriza-se pela formação de lesões vesiculares e crostosas na pele e/ou mucosas dos animais. O vírus da varíola humana (smallpox) é o mais importante vírus dessa família. Dentre os patógenos de animais domésticos, o mais comum em nosso meio é o ORFV, uma doença caracterizada por lesões vesiculares e pustulares na região dos lábios, narinas e cascos.



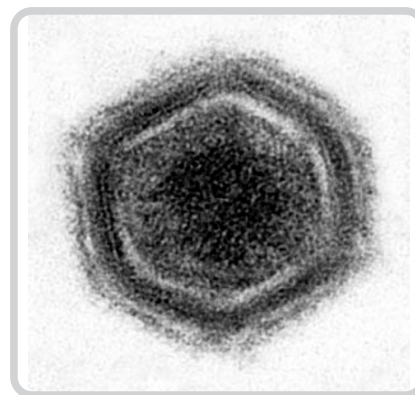
Fonte: Dr Stewart McNulty (web.qub.ac.uk).

Figura 2.1. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Poxviridae*.

5.1.2 Família: *Asfarviridae*

Gênero: *Asfivirus*

Espécie: vírus da peste suína africana (AFSV).



Fonte: Dra Sharon Brookes, Pirbright, UK (ICTVdB).

Figura 2.2. Fotografia de microscopia eletrônica de um vírion da família *Asfarviridae* (ASFV).

O ASFV é o único vírus classificado nessa família. Os vírions do ASFV possuem envelope lipoprotéico e um capsídeo icosaédrico formado por 1.892 a 2.172 unidades estruturais. O diâmetro das partículas virais varia entre 175 e 215 nm. O genoma consiste de uma molécula de DNA de cadeia dupla linear, com 170 a 190 kb. O vírus replica no citoplasma da célula hospedeira. O ASFV é transmitido por carrapatos do gênero *Ornithodoros*, constituindo-se no único arbovírus entre os vírus DNA. Esse vírus é mantido na natureza em suídeos selvagens e, ocasionalmente, é transmitido aos suínos domésticos. O vírus é encontrado na África, mas já foi esporadicamente introduzido na Europa, onde causou doença em suínos de alguns países. A peste suína africana é caracterizada pela produção de hemorragias, principalmente nos órgãos linfóides. O único relato da doença no Brasil ocorreu em 1978, no Rio de Janeiro. Atualmente o ASFV é considerado exótico no País.

5.1.3 Família: *Herpesviridae*

Subfamília: *Alphaherpesvirinae*

Gêneros:

– *Simplexvirus*: herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) ou vírus da mamilita herpética (BMH), herpesvírus B (macacos), vírus do herpes simplex humano (HSV-1, HSV-2);

– *Varicellovirus*: BoHV-1 ou vírus da rinotraqueíte (IBRV), BoHV-5, SHV-1 ou PRV, herpesvírus eqüino tipos 1, 3 e 4 (EHV-1, EHV-3, EHV-4), herpesvírus canino 1 (CaHV-1), herpesvírus felino tipo 1 (vírus da rinotraqueíte felina, FeHV-1), herpesvírus caprino tipo 1 (CpHV-1);

– *Mardivirus*: vírus da doença de Marek;

– *Iltovirus*: vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas (ILTV);

Subfamília: *Betaherpesvirinae*

Gêneros:

– *Cytomegalovirus*: citomegalovírus suíno;

– *Muromegalovirus*: citomegalovírus do camundongo 1;

– *Roseolovirus*: herpesvírus humano 6 (HHV-6).

Vários betaherpesvírus animais ainda não foram classificados em gêneros.

Subfamília: *Gammaherpesvirinae*

Gêneros:

– *Lymphocryptovirus*: vírus Epstein-Barr (EBV) humano;

– *Rhadinovirus*: vírus da febre catarral maligna (MCFV);

– *Ictalurivirus*: herpesvírus do *catfish* de canal.

A família *Herpesviridae* abriga um grupo grande e diverso de vírus encontrados em virtualmente todas as espécies de vertebrados. Os vírions contêm envelope, capsídeo icosaédrico e o diâmetro pode variar entre 120 e 300 nm. Entre o capsídeo e o envelope, existe uma camada protéica denominada tegumento. O genoma consiste de uma molécula de DNA de cadeia dupla linear, com 120 a 250 kb. Os vírus dessa família possuem uma importante propriedade biológica em comum, que é a capacidade de estabelecer infecções latentes nos seus hospedeiros. Embora todos os herpesvírus apresentem algumas características em comum, os vírus das três subfamílias apresen-

tam diferenças biológicas e moleculares. Os vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae* apresentam um ciclo replicativo rápido e lítico em cultivo celular, estabelecem infecções latentes em neurônios e produzem lesões vesiculares em membranas mucosas. Vários vírus animais são classificados nessa subfamília, cujo protótipo é o HSV-1. Os vírus da subfamília *Betaherpesvirinae* apresentam uma replicação lenta em cultivo celular e estabelecem infecções latentes em glândulas secretórias e no tecido linforeticular. O herpesvírus humano tipo 5 (HHV-5) ou citomegalovírus humano (CMV) é o protótipo dessa subfamília. Os vírus da subfamília *Gammaherpesvirinae* infectam linfócitos de forma lítica ou latente e alguns deles possuem potencial oncogênico. Nesta subfamília, está classificado apenas um patógeno de animais, o MCFV, uma doença sistêmica de bovinos. O EBV, agente de mononucleose e tumores em humanos, é o protótipo dessa subfamília.



Fonte: Dra Linda Stannard (web.uct.ac.za).

Figura 2.3. Fotografia de microscopia eletrônica de um vírion da família *Herpesviridae* (HSV-1).

5.1.4 Família: *Adenoviridae*

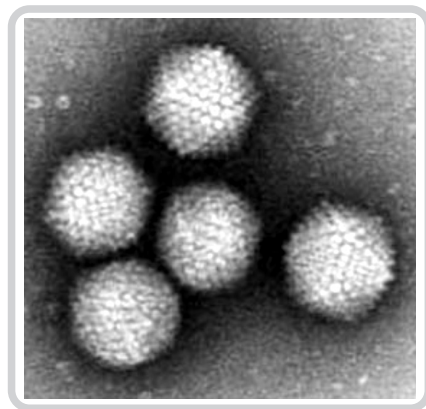
Gêneros:

– *Mastadenovirus*: vírus da hepatite infecciosa canina (CAV-1), vírus da traqueobronquite infecciosa canina (CAV-2), adenovírus suínos (SAV-1-9), adenovírus bovinos (BAV-1-9), adenovírus eqüino (EAV-1 e 2);

– *Aviadenovirus*: vírus da síndrome da queda de postura;

– *Atadenovirus*: adenovírus ovino D;

– *Siadenovirus*: adenovírus dos perus B.



Fonte: Dra Cornelia Büchen-Osmond (ICTVdB).

Figura 2.4. Fotografia de microscopia eletrônica de víriões da família *Adenoviridae*.

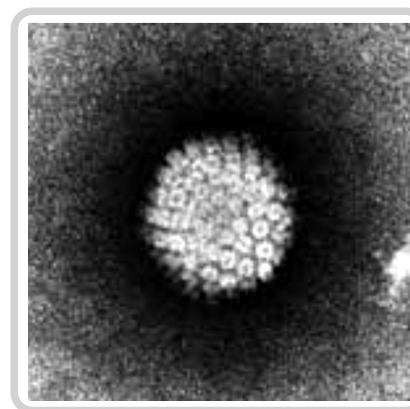
Os adenovírus possuem víriões icosaédricos grandes (diâmetro de 80 a 100 nm), sem envelope e apresentam fibras de 9 a 35 nm nos vértices. O capsídeo envolve uma única molécula de DNA de cadeia dupla linear, com 36 a 44 kb. Os adenovírus replicam no núcleo das células hospedeiras e, como alguns outros vírus DNA, a transcrição dos genes é realizada pela maquinaria célula e ocorre de forma ordenada. Alguns produtos dos genes virais interferem com o controle do ciclo celular, e alguns adenovírus possuem potencial oncogênico. O vírus também codifica produtos que antagonizam os mecanismos inatos da resposta imunológica. Os adenovírus são encontrados em humanos, diversas espécies de mamíferos e aves e, em geral, são pouco patogênicos. Quando associados com manifestações clínicas, geralmente estão envolvidos em sinais respiratórios leves em animais e humanos. A doença de maior repercussão causada por esses vírus em animais provavelmente seja a hepatite infecciosa canina. Os adenovírus têm sido intensivamente estudados como vetores para terapia genética e vacinas.

5.1.5 Família: *Papillomaviridae*

Gêneros:

- *Alphapapillomavirus*: vários papilomavírus humanos (protótipo: HPV-32);
- *Betapapillomavirus*: vários papilomavírus humanos (protótipo: HPV-5);
- *Gamma papillomavirus*: vários papilomavírus humanos (protótipo: HPV-4);

- *Deltapapillomavirus*: papilomavírus do alce europeu (EEPV), papilomavírus de cervídeos (DPV), papilomavírus bovino (BPV-1 e BPV-2) e papilomavírus ovino (OvPV-1 e OvPV-2);
- *Epsilonpapillomavirus*: papilomavírus bovino tipo 5 (BPV-5);
- *Zetapapillomavirus*: papilomavírus eqüino 1 (EcPV-1);
- *Etapapillomavirus*: papilomavírus de aves (FcPV);
- *Thetapapillomavirus*: papilomavírus dos psitacídeos (PePV);
- *Iotapapillomavirus*: papilomavírus dos *Mastomys natalensis* (MNPV);
- *Kappapapillomavirus*: papilomavírus dos coelhos (CRPV e ROPV);
- *Lambdapapillomavirus*: papilomavírus oral canino (COPV), papilomavírus felino (FDPV);
- *Mupapillomavirus*: papilomavírus humano (HPV-1 e HPV-63);
- *Nupapillomavirus*: papilomavírus humano 41 (HPV-41);
- *Pipapillomavirus*: papilomavírus oral do hamster (HaOPV);
- *Xipapillomavirus*: papilomavírus bovinos (BPV-3, BPV-4 e BPV-6);
- *Omikronpapillomavirus*: papilomavírus dos cetáceos (PsPV).



Fonte: www.oralcancerfoundation.org

Figura 2.5. Fotografia de microscopia eletrônica de um vírião da família *Papillomaviridae* (Papilomavírus humano).

Os papilomavírus são vírus pequenos, sem envelope, com 52 a 55 nm de diâmetro e simetria icosaédrica. O capsídeo é formado por 72 cap-

sômeros, envolvendo o DNA circular de cadeia dupla de aproximadamente 8 kbp. Os vírus replicam no núcleo de células epiteliais do tecido descamativo, e as sucessivas etapas da replicação ocorrem em células com estágios diferentes de diferenciação. As etapas finais da replicação ocorrem apenas nas células maduras das camadas granulosa e córnea da pele. Os papilomavírus são agentes etiológicos dos papilomas, também denominados verrugas, que consistem em lesões nodulares na pele e mucosas de animais e humanos. Alguns desses vírus podem induzir a produção de tumores malignos. Esse problema é particularmente importante no caso das verrugas genitais humanas, também conhecidas como condilomas. Existem mais de 60 sorotipos diferentes de papilomavírus causando doenças em humanos, e alguns deles são considerados de alto risco para a produção de tumores, como é o caso dos HPV 16 e HPV 18, que estão envolvidos no desenvolvimento de câncer de colo de útero em mulheres. As espécies bovina, equina e canina são as mais freqüentemente afetadas por papilomas, no entanto, o desenvolvimento de tumores malignos nessas espécies não é comum. A participação de papilomavírus na indução de tumores em animais parece ser limitada ao carcinoma de esôfago, induzido pela ingestão de samambaia em bovinos.

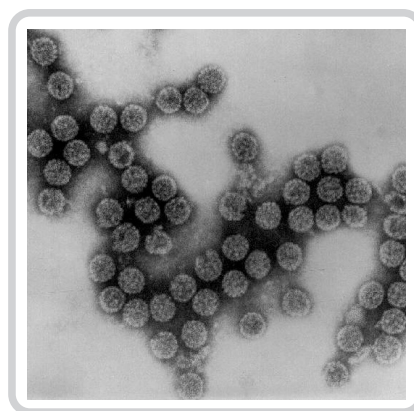
5.1.6 Família: *Polyomaviridae*

Gênero:

– *Polyomavirus*: vírus símio 40 (SV-40), poliomavírus de camundongos (PoV), vírus BK (humanos), vírus JC (humanos), vários poliomavírus de mamíferos e aves.

Os poliomavírus estão entre os menores vírus DNA. Possuem vírions icosaédrico-esféricos com 45 nm, sem envelope, e uma molécula de DNA de fita dupla circular como genoma (5 kb). Os vírions são compostos por 72 capsômeros, formados por três proteínas: VP1, VP2 e VP3. O genoma está associado com histonas celulares, formando uma estrutura semelhante à cromatina celular. A família *Polyomaviridae* era classificada anteriormente como uma subfamília da *Papovaviridae*, cuja denominação derivava dos

vírus protótipos: *Pa* (papilomavírus de coelhos); *po* (poliomavírus de camundongos) e *va* (agente vacuolizante, SV-40). Atualmente, os poliomavírus e o protótipo SV-40 são classificados separadamente, na família *Polyomaviridae*. O interesse maior nesses vírus iniciou-se com a descoberta de que o SV-40 e outros poliomavírus eram capazes de produzir tumores em hamsters (por isso foram denominados pequenos vírus DNA tumorais). Embora estudos extensivos realizados durante décadas não tenham sido capazes de demonstrar associação entre o SV-40 e tumores humanos, estudos recentes demonstraram a presença de seqüências de DNA e antígenos do SV-40 em certos tumores raros em humanos, renovando o interesse por esse vírus. Os poliomavírus foram muito estudados como modelos para Virologia e biologia molecular. O protótipo da família é o SV-40, um vírus encontrado como contaminante de vacinas contra a poliomielite nos anos 1950.



Fonte: PHIL Library, CDC.

Figura 2.6. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Polyomaviridae*.

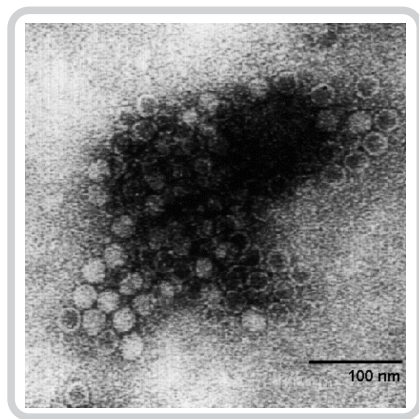
5.1.7 Família: *Parvoviridae*

Subfamília: *Parvovirinae*

Gêneros:

- *Parvovirus*;
- Patógenos animais: parvovírus canino tipos 1 e 2 (CPV-1; CPV-2), parvovírus felino (vírus da panleucopenia felina, FPLV), parvovírus suíno (PPV), parvovírus bovino (BPV);
- *Erythrovirus*: vírus B19 humano;

- *Dependovirus*: vírus adeno-associado 2 (AAV);
- *Amdovirus*: *Aleutian mink disease virus*;
- *Bocavirus*: parvovírus bovino, vírus minuto dos cães.



Fonte: Dra Cornelia Büchen-Osmond (ICTVdB).

Figura 2.7. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Parvoviridae*.

Subfamília: *Densovirinae*

Gêneros:

- *Densovirus*: densovírus da *Junonia coenia*;
- *Iteravirus*: densovírus da *Bombyx mori*;
- *Brevidensovirus*: densovírus do mosquito *Aedes aegypti*;
- *Pefudensovirus*: densovírus da *Periplaneta fuliginosa*.

Os parvovírus são vírus muito pequenos e, até há pouco tempo, eram considerados os menores vírus de animais e/ou humanos. Os vírions possuem um diâmetro de 25 nm, não possuem envelope e apresentam uma aparência esférica à microscopia eletrônica. Os vírus dessa família apresentam um DNA de cadeia simples linear de, aproximadamente, 5.2 kb. Alguns membros dessa família necessitam de uma co-infecção viral para realizar a sua replicação (*Dependovirus*), o que não é o caso do gênero *Parvovirus*, no qual estão classificados importantes patógenos de animais e humanos. A replicação ocorre no núcleo de células que estão em processo de mitose, mais especificamente na fase S do ciclo celular. Os principais agentes de doença dessa família são os parvovírus que causam doenças gastroentéricas em caninos e felinos. O parvovírus suíno é um importante agente etiológico de perdas reprodu-

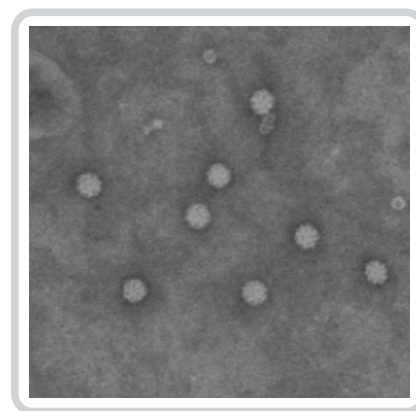
tivas na suinocultura. O parvovírus humano B-16 tem sido associado com abortos em mulheres.

5.1.8 Família: *Circoviridae*

Gêneros:

- *Circovirus*: circovírus suíno tipos 1 e 2 (PCV-1; PCV-2), vírus da doença das penas e bicos dos psitacídeos (BFDV), circovírus dos pom-bos (PiCV), circovírus dos gansos (GoCV), circovírus do canário (CaCV);
- *Gyrovirus*: vírus da anemia das galinhas (CAV).

Os vírus dessa família são os menores vírus conhecidos que infectam animais. O diâmetro dos vírions, que não possuem envelope, pode variar entre 17 e 22 nm. Esses vírions apresentam uma aparência esférica à microscopia eletrônica. O núcleo do vírion é formado por uma molécula de DNA circular de cadeia simples. A replicação viral ocorre no núcleo da célula hospedeira, na fase S do ciclo celular. Essa família possui um número pequeno de patógenos animais, entre os quais o agente da CAV e o vírus da doença debilitante dos leitões (PCV-2). Circovírus também já foram identificados em humanos.



Fonte: Dr Stewart McNulty (web.qub.ac.uk).

Figura 2.8. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Circoviridae*.

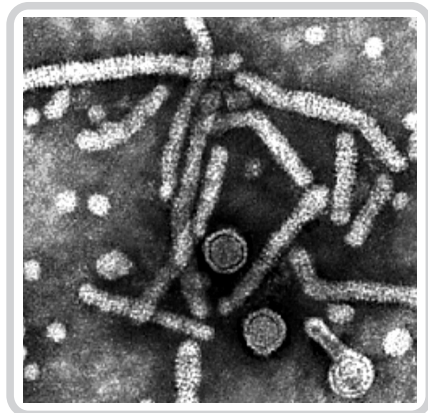
5.1.9 Família: *Hepadnaviridae*

Gêneros:

- *Orthohepadnavirus*: vírus da hepatite B humana (HBV), vírus do esquilo do solo (GSHV),

vírus das marmotas (WHV) e outros recentemente identificados em várias espécies;

– *Avihepadnavirus*: vírus da hepatite B dos marrecos (DHBV).



Fonte: Dra Linda Stannard (web.uct.ac.za).

Figura 2.9. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Hepadnaviridae* (vírus da hepatite B).

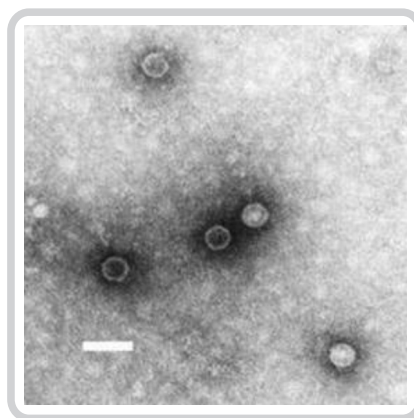
Os vírus da família *Hepadnaviridae* causam hepatite em humanos e em algumas espécies de animais. Esses vírus freqüentemente estabelecem infecção persistente, e a persistência viral no hospedeiro está associada com cirrose hepática e hepatocarcinoma. As células infectadas pelos hepadnavírus produzem três tipos de partículas víricas: os vírions completos possuem um diâmetro de 42-47 nm e são compostos por um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope lipoprotéico. Partículas esféricas e filamentosas, compostas apenas pelas proteínas do envelope e porções da membrana plasmática, também são produzidas pelas células infectadas. O genoma viral é composto por uma molécula de DNA circular de cadeia parcialmente dupla. O ciclo replicativo dos hepadnavírus ocorre parte no núcleo e parte no citoplasma da célula hospedeira e envolve uma etapa de transcrição reversa. Os hepadnavírus possuem tropismo marcante por células hepáticas e, freqüentemente, produzem infecções hepáticas persistentes/crônicas. O HBV é o único patógeno humano classificado nessa família. O vírus animal mais conhecido dessa família é o DHBV, que causa uma doença muito similar à hepatite B humana.

5.2 Vírus com genoma RNA de sentido positivo

5.2.1 Família: *Picornaviridae*

Gêneros:

- *Enterovirus*: enterovírus bovinos 1 e 2 (BEV-1, BEV-2), enterovírus suíno 1-13 (PEV-1-13), poliovírus (PV);
- *Rhinovirus*: rinovírus bovino 1-3, rinovírus humanos (HRV-2-100);
- *Hepatovirus*: vírus da hepatite A humano (HAV);
- *Cardiovirus*: vírus da encefalomiocardite murina Theiler (EMCV);
- *Aphthovirus*: vírus da febre aftosa (FMDV);
- *Parechovirus*: parechovírus humano;
- *Erbovirus*: vírus da rinite equina B (ERBV);
- *Kobuvirus*: Aichi vírus (AiV);
- *Teschovirus*: teschovírus suíno 1 (PTV).



Fonte: www.vetsciences.free.fr

Figura 2.10. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Picornaviridae* (poliovírus).

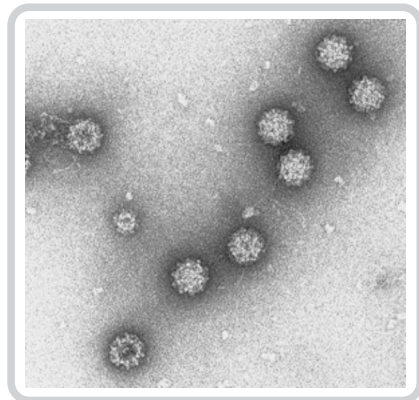
Os picornavírus possuem vírions esféricos pequenos, não-envelopados, com 28 a 30 nm de diâmetro. O capsídeo icosaédrico é formado por 60 cópias de cada uma das quatro proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4. Além das proteínas do capsídeo, cada vírion possui também uma proteína denominada VPg, associada ao ácido nucléico na extremidade 5'. O genoma é composto de uma cadeia simples de RNA, de sentido positivo de 7.2 a 8.4 kb. A replicação do vírus ocorre inteiramente

no citoplasma, e o RNA é traduzido diretamente pelos ribossomas. A infecção geralmente é aguda e citolítica, ocorrendo a liberação dos vírions pela lise celular. Essa família contém vários patógenos muito importantes para humanos e animais, como o vírus da poliomielite, o vírus da hepatite A, os rinovírus, os enterovírus, o FMDV, entre outros.

5.2.2 Família: *Caliciviridae*

Gêneros:

- *Vesivirus*: calicivírus felino (FCV), vírus do exantema vesicular dos suínos (SVEV), vírus dos leões marinhos de San Miguel (SMSV);
- *Lagovirus*: vírus da doença hemorrágica dos coelhos (RHDV), vírus da doença hemorrágica das lebres pardas (EBHSV);
- *Norovirus*: vírus de Norwalk (humano);
- *Sapovirus*: vírus de Sapporo (humano).



Fonte: www.fli.bund.de

Figura 2.11. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Caliciviridae*.

Os calicivírus são vírus pequenos (diâmetro entre 30 a 40 nm) sem envelope. O capsídeo é formado por 60 cópias de uma única e grande proteína. À microscopia eletrônica, o vírus apresenta depressões características na superfície, que lembram copos ou cálices, o que originou a denominação da família. O genoma consiste de um ácido nucléico RNA linear de cadeia simples e sentido positivo, com extensão de 7.4 a 7.7 kb. Semelhante aos picornavírus, o RNA dos calicivírus apresen-

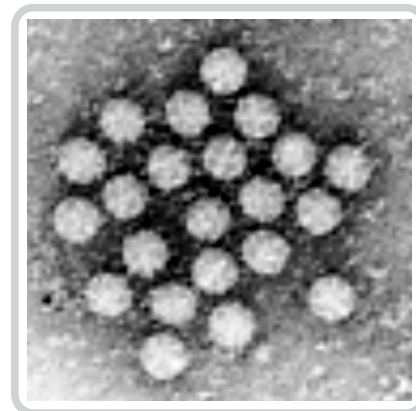
ta uma proteína (VPg) covalentemente ligada na extremidade 5'. Em células infectadas, é também detectado um RNA subgenômico de 2.2 a 2.4 kb. A replicação do vírus ocorre no citoplasma, e os vírus são liberados por lise celular. O patógeno animal mais conhecido dessa família é o calicivírus felino, associado com doença respiratória em gatos. Um calicivírus (norovírus) tem sido considerado um dos principais agentes de diarreia em pessoas de todas as idades.

5.2.3 Família: *Astroviridae*

Gêneros:

- *Mamastrovirus*: astrovírus humanos e de várias espécies de animais domésticos;
- *Avastrovirus*: astrovírus dos perus.

Os astrovírus são pequenos, com 28 a 30 nm de diâmetro, sem envelope e com capsídeo icosaédrico. A superfície de algumas partículas víricas apresenta estruturas que lembram estrelas de cinco ou seis pontas, o que originou o nome da família. A replicação ocorre no citoplasma, e os vírus são liberados por lise celular. Os astrovírus têm sido isolados de casos de gastroenterite de bovinos, suínos, cães, gatos, perus, patos e humanos. Na grande maioria das espécies, a doença se manifesta como uma diarreia passageira e raramente há complicações. Entretanto, em patos, uma hepatite com altos índices de mortalidade tem sido descrita.



Fonte: Dra Cornelia Büchen-Osmond (ICTVdB).

Figura 2.12. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Astroviridae*.

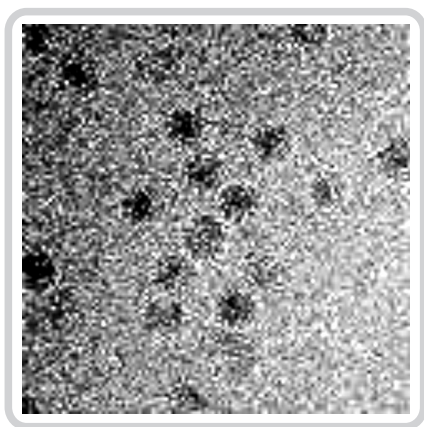
5.2.4 Família: *Togaviridae*

Gêneros:

– *Alfavirus*: vírus das encefalites eqüinas do leste (EEEV), oeste (WEEV) e venezuelana (VEEV), além de outros arbovírus zoonóticos (Semliki Forest virus, SFV; Ross River virus, RRV; Sindbis, SIN);

– *Rubivirus*: vírus da rubéola (humano).

Os togavírus possuem vírions esféricos, com diâmetro aproximado de 70 nm. O capsídeo é envolto por um envelope lipídico que apresenta peplômeros formados por duas glicoproteínas. O genoma consiste de uma molécula de RNA linear, de sentido positivo, com extensão de 9,7 a 11,8 kb. As proteínas não-estruturais são sintetizadas a partir de uma poliproteína traduzida diretamente do RNA genômico. As proteínas não-estruturais são produzidas pela tradução de um mRNA subgenômico, sintetizado a partir de uma cópia de RNA de sentido anti-genômico. A replicação ocorre inteiramente no citoplasma e a liberação da progênie viral ocorre por brotamento na membrana plasmática. Os *Alfavirus* são transmitidos por insetos e a maioria deles é zoonótica. Os EEEV, WEEV e VEEV de maior importância para a Veterinária estão classificados no gênero *Alfavirus*. O vírus da rubéola, também classificado nessa família, é um agente que infecta exclusivamente humanos.



Fonte: Dra Tuli Mukhopadnyay (ICTVdB).

Figura 2.13. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Togaviridae*.

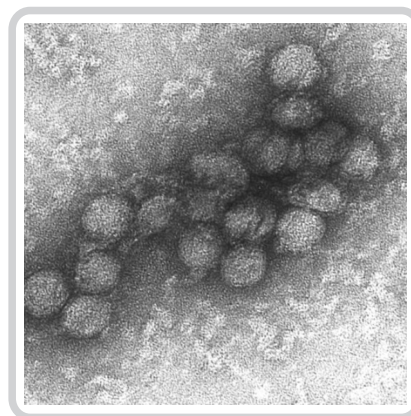
5.2.5 Família: *Flaviviridae*

Gêneros:

– *Flavivirus*: vírus da febre amarela (YFV, humano e de primatas), vírus da dengue (humano), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus Murray Valley (MVEV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus Wesselsbron (WBV), vírus do Louping Ill. Com possível exceção do vírus da dengue, os demais vírus são zoonóticos;

– *Pestivirus*: vírus da diarréia viral bovina tipos 1 e 2 (BVDV-1; BVDV-2), vírus da peste suína clássica (CSFV), vírus da doença da fronteira (BDV);

– *Hepacivirus*: vírus da hepatite C (humano).



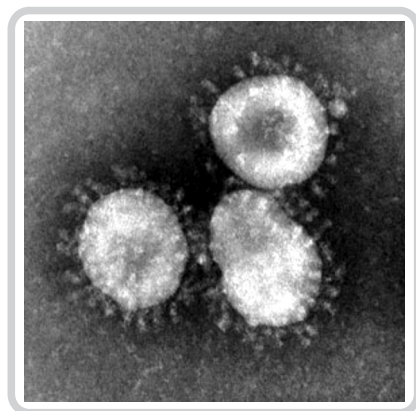
Fonte: PHIL Library, CDC.

Figura 2.14. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Flaviviridae* (vírus do Nilo Ocidental).

Os membros da família *Flaviviridae* possuem vírions envelopados, com capsídeo possivelmente icosaédrico e com 45-60 nm de diâmetro. Apresentam um genoma RNA linear de sentido positivo (9,5 a 12,5 kb), que é traduzido em uma poliproteína, posteriormente clivada nas proteínas individuais por enzimas virais e celulares. O genoma é organizado de forma semelhante em todos os membros da família, com as proteínas estruturais codificadas no primeiro terço (extremidade 5') e as não-estruturais nos terços finais (extremidade 3'). No gênero *Flavivirus*, estão classificados vários agentes de doenças hemorrágicas e encefalites transmitidas por mosquitos, entre elas o YFV, o vírus da dengue e o WNV. Im-

portantes patógenos para a medicina veterinária são classificados no gênero *Pestivirus*, entre eles o BVDV e o CSFV. O vírus da hepatite C de humanos é o único membro do gênero *Hepacivirus*.

5.2.6 Família: *Coronaviridae*



Fonte: Dra Cornelia Büchen-Osmond (ICTVdB).

Figura 2.15. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Coronaviridae* (SARS CoV).

Ordem Nidovirales

Gênero:

– *Coronavirus*: vírus da bronquite infecciosa das aves (IBV), coronavírus dos perus (TCoV), vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV), coronavírus felino (FeCoV), vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), coronavírus canino (CCoV), coronavírus bovino (BCoV), coronavírus humano (HuCoV), vírus da pneumonia asiática (SarsCoV – humano);

– *Torovirus*: torovírus eqüino (EToV), torovírus bovino (BToV), torovírus suíno (SToV), torovírus humano (HToV), vírus Berne (BeV), vírus Breda (BrV).

A morfologia dos vírions, quando observada ao microscópio eletrônico, deu origem ao nome da família. Os vírions do gênero *Coronavirus* possuem diâmetro de 80 a 220 nm e forma esférica; os do gênero *Torovirus*, de 120 a 140 nm e aparência bacilar ou na forma de rim. Vírus de ambos os gêneros apresentam envelope lipídico com peplômeros que se projetam externamente por até 20 nm, e que dão ao vírion o aspecto de coroa. Os coronavírus apresentam um nucleo-

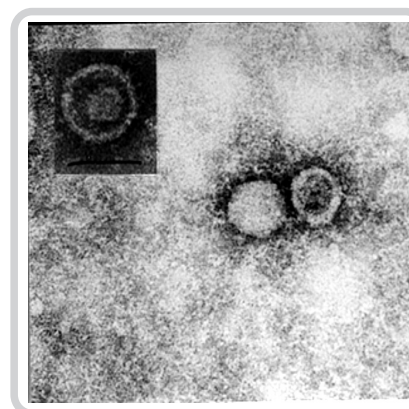
capsídeo helicoidal, que possui uma molécula de RNA linear de cadeia simples e sentido positivo. Dentre os vírus RNA, os coronavírus possuem o maior genoma, podendo variar de 27 a 32 kb. A síntese de um grupo de RNAs subgenômicos durante a replicação viral na célula infectada é um aspecto comum aos vírus dessa família, assim como aos demais vírus da ordem Nidovirales. A replicação ocorre inteiramente no citoplasma. Esses vírus causam importantes doenças entéricas em animais, incluindo a gastroenterite transmissível dos suínos (TGE) e a peritonite infecciosa dos felinos (FIP). Os coronavírus humanos estão associados principalmente com os resfriados comuns. O vírus da SARS, agente de doença respiratória severa na Ásia entre 2003 e 2004, também é classificado nessa família.

5.2.7 Família: *Arteriviridae*

Ordem: *Nidovirales*

Gênero:

– *Arterivirus*: vírus da arterite eqüina (EVAV), vírus elevador da lactato desidrogenase (LDEV), vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV).



Fonte: Dr D. Robinson, South Dakota State University.

Figura 2.16. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Arteriviridae* (PRRSV).

O nome dessa família originou-se da patologia induzida por esses vírus em eqüinos, a arterite. Os arterivírus apresentam diâmetro de 50 a 70 nm e possuem envelope. O genoma consiste de uma molécula de RNA linear de sentido positivo,

com extensão entre 13 e 15 kb. De forma similar ao que ocorre com os coronavírus, RNAs subgenômicos são produzidos durante a replicação desses vírus no citoplasma das células infectadas. A liberação dos vírus se dá por exocitose após brotamento dentro de vesículas no citoplasma. Além do vírus da arterite eqüina, está também classificado nessa família o PRRSV. Ambas as doenças são consideradas oficialmente exóticas no Brasil. Entretanto, estudos sorológicos demonstraram a presença de anticorpos contra o EVAV em eqüinos de alguns estados brasileiros.

5.3 Vírus com genoma RNA de sentido negativo não-segmentado

5.3.1 Família: *Paramyxoviridae*

Ordem: *Mononegavirales*

Subfamília: *Paramyxovirinae*

Gêneros:

- *Respirovirus*: vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bPI-3V), vírus Sendai (camundongos);
- *Morbillivirus*: vírus da cinomose canina (CDV), vírus da peste bovina (Rinderpest), vírus da peste dos pequenos ruminantes, morbilivírus dos golfinhos, morbilivírus de focas (PhDV), vírus do sarampo (humanos);
- *Rubulavirus*: vírus da parainfluenza canina tipo 2 (cPIV-2), vírus da caxumba (humanos);
- *Henipavirus*: vírus Hendra (HeV), vírus Nipah (NiV);
- *Avulavirus*: vírus da doença de Newcastle (NDV), paramixovírus das aves 2 a 9 (APMV-2-9).

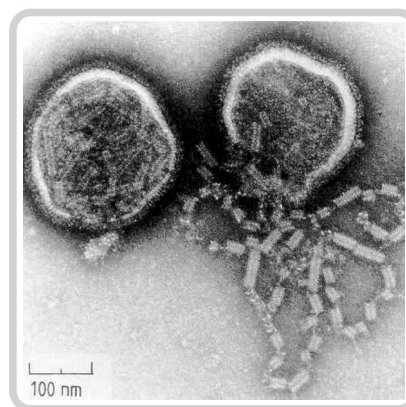
Subfamília: *Pneumovirinae*

Gêneros:

- *Pneumovirus*: vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) e humano (hRSV);
- *Metapneumovirus*: metapneumovírus das aves – AMPV (vírus da rinotraqueíte dos perus).

Os vírus dessa família são grandes, pleomórficos, envelopados, com diâmetro variando de 150 a 350 nm. Possuem um genoma RNA linear de sentido negativo, cadeia simples, com 16 a 20 kb. No envelope, são encontradas as glicoproteínas hemaglutinina (HN) e de fusão (F). Em alguns vírus, as glicoproteínas de superfície

apresentam também uma atividade de neuraminidase. A hemaglutinina é a proteína viral responsável pela ligação ao receptor celular, e a proteína F realiza a fusão do envelope viral com a membrana da célula. A replicação e reunião dos componentes virais ocorrem no citoplasma, e a liberação é feita por brotamento da membrana plasmática. Na partícula viral, também são encontradas algumas cópias da enzima polimerase, que é necessária para iniciar a replicação do vírus. Esses vírus estão associados principalmente com doenças respiratórias e foram identificados apenas em mamíferos e aves. Alguns morbilivírus podem causar infecção persistente. Entre os vírus classificados nessa família e que causam doença em animais incluem-se o CDV e o NDV em aves, entre outros. O hRSV, o vírus do sarampo e da caxumba são patógenos importantes de humanos.



Fonte: Dr Samuel Baron (ICTVdB).

Figura 2.17. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Paramyxoviridae* (vírus Sendai).

5.3.2 Família: *Rhabdoviridae*

Ordem: *Monegavirales*

Gêneros:

- *Vesiculovirus*: vírus da estomatite vesicular (VSV), vários outros vírus isolados de insetos, alguns que infectam mamíferos;
- *Lyssavirus*: vírus da raiva (RV), lissavírus de morcegos Lagos;
- *Efemerovirus*: vírus da febre efêmera dos bovinos (BEFV);

- *Novirhabdovirus*: vírus da necrose hemato-poiética infecciosa (HNV);
- *Cytorhabdovirus*: vírus da necrose amarela da alface (LNYV);
- *Nucleorhabdovirus*: vírus do tomate pequeno amarelo (PYDV).



Fonte: Dr. F. Murphy (ICTVdB).

Figura 2.18. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Rhabdoviridae*.

Os vírions dessa família possuem uma morfologia característica, lembrando um projétil de arma de fogo, com uma das extremidades arredondadas e a outra romba. O diâmetro dos vírions varia de 70 a 85 nm, e o comprimento pode variar de 130 a 380 nm. O vírus é envelopado e apresenta peplômeros de 8 a 10 nm na superfície; o nucleocapsídeo é helicoidal. O genoma consiste de uma cadeia simples de RNA linear de sentido negativo e extensão de 10 a 13 kb. A replicação ocorre no citoplasma. O RNA genômico de sentido negativo é inicialmente transcrito em RNAs subgenômicos, que são traduzidos nas proteínas necessárias à formação de novas partículas virais. A replicação do genoma ocorre a partir de um intermediário positivo. O RV, que é um dos vírus zoonóticos mais importantes, é o principal vírus dessa família. O VSV é outro importante patógeno animal, capaz de infectar várias espécies. Vários rabdovírus de peixes e de plantas também são agrupados nessa família.

5.3.3 Família: *Filoviridae*

Ordem: Mononegavirales

Gêneros:

- *Marburgvirus*: vírus de Marburg;
- *Ebolavirus*: vírus ebola.

Os vírus dessa família apresentam formas filamentosas, pleomórficas, com diâmetro de 80 nm e extensão que pode atingir até 14.000 nm. Podem ser vistas formas de U, de 6 ou, ainda, formas circulares. O genoma consiste de uma única molécula de RNA linear, de cadeia simples e sentido negativo, compondo um nucleocapsídeo helicoidal. A replicação ocorre no citoplasma e o vírus é liberado por brotamento na membrana plasmática. Os vírus dessa família causam doenças hemorrágicas em humanos. Infecção natural com vírus de Marburg e a cepa Reston do vírus ebola também causa doença hemorrágica em macacos. Doença experimental pode ser induzida através de inoculação em macacos, cobaias, hamsters e camundongos. A manipulação desses vírus só é permitida em laboratórios de nível 4 de biosegurança. O vírus ebola é um dos vírus mais letais já identificados para humanos. A história natural desses vírus ainda não é bem conhecida.



Fonte: Dr F. Murphy (ICTVdB).

Figura 2.19. Fotografia de microscopia eletrônica de um vírion da família *Filoviridae* (vírus Ebola).

5.3.4 Família: *Bornaviridae*

Ordem: *Mononegavirales*

Gênero:

– *Bornavirus*: vírus da doença de Borna (BDV).

Os bornavírus são esféricos e envelopados, com diâmetro de 90 nm. Possuem um genoma RNA de cadeia simples, sentido negativo e 8.9 kb. Apesar do genoma RNA, os vírus replicam no núcleo, onde produzem corpúsculos de inclusão. Esses vírus são agentes etiológicos reconhecidos de doença neurológica em ovinos e eqüinos, mas já foram isolados também de gatos e bovinos. Além disso, dados sorológicos e moleculares recentes têm associado os bornavírus com doenças neuropsiquiátricas humanas.

5.4 Vírus com genoma RNA de sentido negativo segmentado

5.4.1 Família: *Orthomyxoviridae*

Gêneros:

– *Influenzavirus A* (FluAV): vírus da influenza A (humanos, aves, eqüinos, suínos, recentemente cães e felídeos);

– *Influenzavirus B* (FluBV): vírus da influenza B (humanos);

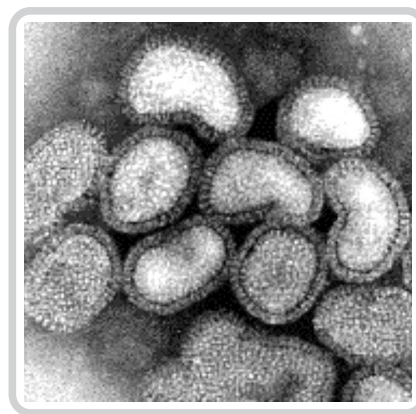
– *Influenzavirus C* (FluCV): vírus da influenza C (humanos, suínos);

– *Thogotovirus*: vírus Thogoto de carrapatos (THOV), vírus Dhori (DHOV). Tem sido detectada sorologia positiva em bovinos e camelos;

– *Isavirus*: vírus da anemia infecciosa do salmão (ISAV).

Os ortomixovírus possuem vírions envelopados pleomórficos, com 80 a 120 nm de diâmetro. No envelope, estão inseridas as glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NE) que se estendem externamente por 10 a 14 nm. O genoma consiste de oito (vírus influenza A), sete (vírus influenza B) ou seis (vírus influenza C) segmentos de RNA linear, sentido negativo de cadeia simples, com extensão total de 10 a 13.6 kb. Cada segmento genômico é empacotado em um nucleocapsídeo helicoidal. A replicação do

genoma ocorre no núcleo das células hospedeiras. Posteriormente, o vírus é liberado da célula por brotamento na membrana plasmática. Os vírus do gênero influenza são os agentes etiológicos da gripe. O vírus influenza A causa gripe em humanos, aves, suínos, cavalos, martas, focas e baleias. O vírus influenza B é patógeno somente de humanos, e os de influenza C, de humanos e suínos. A natureza segmentada do genoma desses vírus facilita a troca dos segmentos genômicos entre vírus das diferentes espécies quando infectam a mesma célula. Esse mecanismo permite, eventualmente, o surgimento de vírus bastante virulentos.



Fonte: Dra Linda Stannard (web.uct.ac.za).

Figura 2.20. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Orthomyxoviridae* (influenza A).

5.4.2 Família: *Bunyaviridae*

Gêneros:

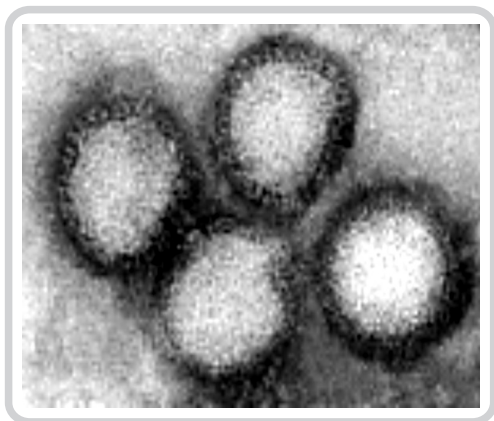
– *Orthobunyavirus*: vírus Bunyamwera (BOTV), vírus La Crosse (LACV), vírus Akabane (AKAV);

– *Hantavirus*: vírus Hantaan (hantavírus – HTNV) de roedores e humanos;

– *Nairovirus*: vírus de Dugbe (DUGV), vírus da febre hemorrágica Crimean Congo (CCHFV), vírus da doença das ovelhas de Nairobi (NSDV);

– *Phlebovirus*: vírus da febre do vale Rift (RVFV);

– *Tospovirus*: vários vírus de plantas.



Fonte: Dra Linda Stannard (web.uct.ac.za).

Figura 2.21. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Bunyaviridae*.

Os buniavírus possuem vírions esféricos ou pleomórficos, envelopados, com diâmetro entre 80 e 120 nm. O genoma consiste de três segmentos de RNA de cadeia simples e sentido negativo, organizados em nucleocapsídeos helicoidais. Esses vírus replicam no citoplasma. O ressortimento é possível entre vírus do mesmo gênero devido à segmentação do genoma. Existe um grande número de vírus classificados nessa família, muitos deles não infectam animais domésticos ou seres humanos, apenas insetos. Os vírus patogênicos dessa família são agentes de doenças respiratórias severas, hepatite, nefrite e encefalite em animais e humanos. Esses vírus são geralmente citopáticos quando inoculados em células de vertebrados, mas são não-citopáticos em células dos vetores invertebrados. A grande maioria dos vírus dessa família é composta de arbovírus isolados ou transmitidos por mosquitos, carrapatos e outros artrópodos. Os vírus do gênero hantavírus são exceções, uma vez que são mantidos e transmitidos por roedores. Alguns desses vírus (como o RVFV e o CCMFV) só podem ser manipulados em laboratório de segurança nível 4.

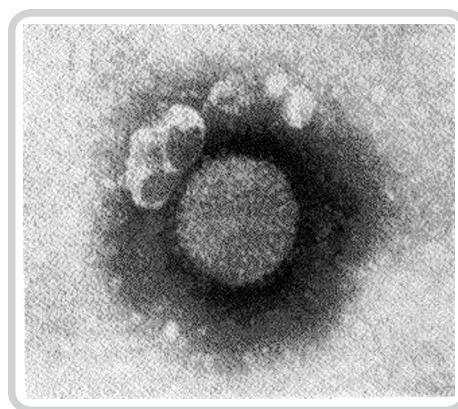
5.4.3 Família: *Arenaviridae*

Gênero:

– *Arenavirus*: vírus da coriomeningite linfocítica dos camundongos (LCMV), Lassaví-

rus de roedores e humanos (LASV), vírus Junin (JUNV), vírus Machupo (MACV), vírus sabiá (SABV), vários outros vírus identificados em roedores e/ou causando doença em humanos.

São vírus envelopados e pleomórficos, cujo diâmetro varia de 100 a 300 nm. Possuem um genoma RNA de cadeia simples, sentido negativo e *ambissense*, com dois segmentos de extensão de 14 a 16 kb. Os vírus replicam no citoplasma e saem da célula por brotação da membrana plasmática. Os arenavírus infectam diferentes espécies de roedores nas Américas, África e Europa de forma crônica e, na maioria das vezes, assintomática. Alguns desses vírus causam doenças severas em humanos, algumas delas com aspectos hemorrágicos. Por isso estão entre os agentes mais importantes das febres hemorrágicas. A transmissão ocorre geralmente através de aerossóis provenientes da urina contaminada desses animais. Entre os arenavírus causadores de doença em humanos está o vírus Lassa, agente etiológico de febre hemorrágica em algumas regiões da África. No continente americano, já foram descritos o MACV na Bolívia, JUNV na Argentina, Guanarito na Venezuela e SABV no Brasil. Todos esses vírus são agentes de doenças hemorrágicas.

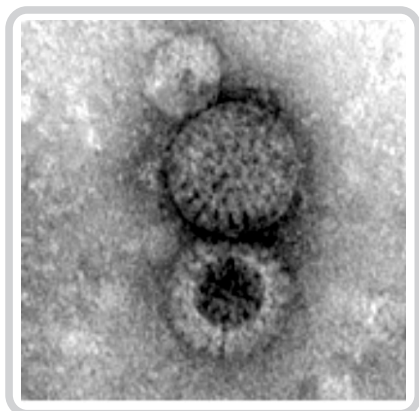


Fonte: Scientific American (ICTVdB).

Figura 2.22. Fotografia de microscopia eletrônica de um vírion da família *Arenaviridae*.

5.5 Vírus com genoma RNA de cadeia dupla

5.5.1 Família: *Reoviridae*



Fonte: Dra. Büchen-Osmond (ICTVdB)

Figura 2.23. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Reoviridae* (rotavírus).

Gêneros:

- *Orthoreovirus*: orthoreovírus de mamíferos (MRV), orthoreovírus de aves (ARV), orthoreovírus de babuínos (BRV);
- *Orbivirus*: vírus da língua azul (BTV-1 a 24), vírus da encefalose eqüina (EEV-1 a 7), vírus da peste eqüina (AHSV-1 a 9);
- *Rotavirus*: rotavírus de todas as espécies (A a G);
- *Coltivirus*: vírus da febre do carrapato do Colorado (CTFV);
- *Aquareovirus*: aquareovírus A (ARV-A a F);

– *Seadornavirus*: vírus kadipiro (KDV).

Existem ainda os gêneros de vírus que infectam plantas e insetos: *Cypovirus*, *Idnoreovirus*, *Fijivirus*, *Oryzavirus* e *Phytoreovirus*.

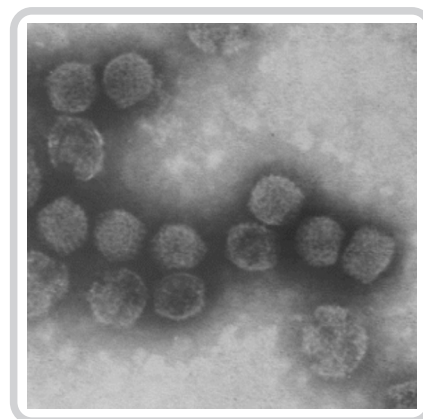
Os reovírus possuem vírions complexos, sem envelope, compostos por duas ou três camadas de proteínas arranjadas de forma concêntrica. O diâmetro desses capsídeos pode variar de 60 a 85 nm e possui simetria icosaédrica. O genoma consiste de moléculas de RNA de cadeia dupla. O número e a extensão desses segmentos variam entre os gêneros; sendo de 10 segmentos e 23 kb para o *Reovírus*, 10 segmentos e 18 kb para o *Orbivirus*, 11 segmentos e 16-21 kb para o *Rota-*

vírus, e 12 segmentos e 27 kb para o *Coltivirus*. A replicação e montagem dos vírions ocorrem no citoplasma, de onde os vírions são liberados. O ressortimento de segmentos de RNA pode ocorrer quando mais de um vírus do mesmo gênero infectam a mesma célula. O BTV e os rotavírus de várias espécies de mamíferos são exemplos de patógenos importantes em veterinária. Os rotavírus são importantes causadores de diarreia, sobretudo em crianças, em países subdesenvolvidos.

5.5.2 Família: *Birnaviridae*

Gêneros:

- *Aquabirnavirus*: vírus da necrose pancreática infecciosa (IPNV);
- *Avibirnavirus*: vírus da doença de Gumboro (IBDV);
- *Entombirnavirus*: vírus X da drosófila.



Fonte: Dr. Stewart McNulty, (www.qub.ac.uk).

Figura 2.24. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Birnaviridae*.

Esses vírus possuem um genoma RNA linear de cadeia dupla com dois segmentos, denominados A e B. A extensão total do genoma varia entre 5.7 e 7 kb. Os vírions são formados por um capsídeo icosaédrico, sem envelope, e diâmetro de 60 nm. Os RNAs mensageiros são sintetizados a partir dos dois segmentos do genoma RNA e uma poliproteína é produzida e, posteriormente, clivada. Maiores detalhes da replicação não são conhecidos. O patógeno mais conhecido dessa família é o IBDV, que afeta galinhas.

5.6 Vírus com genoma RNA que realizam transcrição reversa

5.6.1 Família: *Retroviridae*

Subfamília: *Orthoretrovirinae*

Gêneros:

– *Alpharetrovirus*: vírus da leucose aviária (ALV), vírus do sarcoma Rous (RSV);

– *Betaretrovirus*: vírus do tumor mamário do camundongo (MMTV), retrovírus Jaagsiekte dos ovinos (JSRV);

– *Gammaretrovirus*: vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da leucemia murina (MuLV);

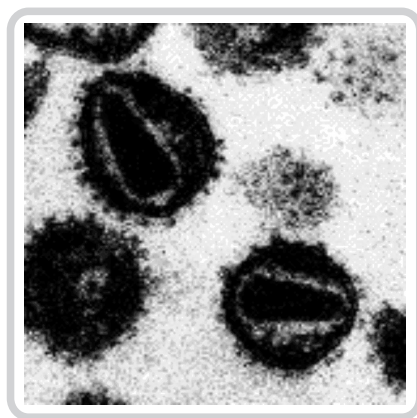
– *Deltaretrovirus*: vírus da leucose bovina (VLB), vírus da leucemia de células T humano (HTLV-1 e 2);

– *Epsilonretrovirus*: vírus do sarcoma dermal de Walleye (WDSV);

– *Lentivirus*: vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV), vírus Maedi-Visna (MMV), vírus da imunodeficiência dos símios (SIV), vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e 2);

Subfamília: *Spumaretrovirinae*

– *Spumavirus*: vírus “foamy” do chimpanzé.



Fonte: University of Otago, NZ (ICTVdB).

Figura 2.25. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Retroviridae* (HIV).

Nessa família, estão classificados vários patógenos de interesse na Medicina Veterinária em diversas espécies. Esses vírus apresentam, como principal característica, uma replicação vi-

ral complexa, incluindo uma etapa de transcrição reversa. Os retrovírus são envelopados e possuem um capsídeo icosaédrico. O diâmetro dos vírions pode variar entre 80 e 100 nm. O genoma é diplóide, consistindo de duas cópias de RNA cadeia simples e sentido positivo. A replicação dos retrovírus ocorre em parte no citoplasma e em parte no núcleo. A replicação viral envolve a síntese de uma cópia DNA do RNA genômico (provírus), que é integrada no cromossomo celular. A síntese de mRNAs, para a síntese protéica e do RNA genômico, ocorre pela transcrição do provírus pela maquinaria celular de transcrição. Pelo fato de integrar o seu provírus ao DNA da célula, os retrovírus infectam o hospedeiro para o resto da vida. Os vírus dessa família estão associados principalmente a doenças tumorais e imunossupressivas. O ALV e o EIAV estão entre os vírus de importância veterinária classificados nessa família. O vírus da AIDS (HIV) é o retrovírus de maior repercussão em saúde humana.

6 Bibliografia consultada

CONDIT, R.C. Principles of Virology. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.2, p.19-51.

DE VILLIERS, E.M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v.324, p.17-27, 2004.

FAUQUET, C.M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. **Virology Journal**, v.2, p.64, 2005.

ICTVdB - **The Universal Virus Database**, version 4. BÜNCHE-OSMOND, C. (Ed). New York, USA: Columbia University.

KOCI, M.D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian astroviruses. **Avian Pathology**, v.31, p.213-227, 2002.

MAYO, M.A. Names of viruses and virus species - an editorial note. **Archives of Virology**, v.147, p.1463-1464, 2002.

MURPHY, F. A. Virus Taxonomy. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. Cap.2, p.15-57.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.

PRINGLE, C.R. Virus nomenclature. **Archives of Virology**, v.144, p.1463-1466, 1999.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified

by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. **Archives of Virology**, v.144, p.421-429, 1999.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy--San Diego. **Archives of Virology**, v.143, p.1449-1459, 1998.

THIEL, H.J.; KONIG, M. Caliciviruses: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.69, p.55-62, 1999.

VAN REGENMORTEL, M.H. Virologists, taxonomy and the demands of logic. **Archives of Virology**, v.151, p.1251-1255, 2006.

VAN REGENMORTEL, M.H.; MAHY, B.M. Emerging issues in virus taxonomy. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.8-13, 2004.

DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS

Mário Celso S. Brum & Rudi Weiblen

3

1 Introdução	61
2 Métodos de detecção e identificação de vírus	61
2.1 Detecção direta por microscopia eletrônica	61
2.2 Detecção de propriedades biológicas dos vírus	63
2.2.1 Hemaglutinação	63
2.2.2 Hemadsorção	65
2.3 Detecção de antígenos	65
2.3.1 Imunofluorescência	65
2.3.2 Imunoperoxidase	66
2.3.3 Ensaio imunoenzimático	67
2.3.4 Radioimunoensaio	67
2.3.5 Imunocromatografia	68
2.3.6 Aglutinação em látex	68
2.3.7 Imunodifusão em ágar	68
2.3.8 Immunoblots	68
2.4 Detecção/identificação de ácidos nucleicos	69
2.4.1 Técnicas de hibridização (<i>Southern, Northern blot</i>)	69
2.4.2 Hibridização <i>in situ</i>	70
2.4.3 Reação de polimerase em cadeia	70
2.4.4 Análise de restrição	73
2.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	73
3 Multiplicação de vírus	73
3.1 Inoculação em animais susceptíveis	74
3.2 Inoculação em ovos embrionados	74
3.3 Inoculação em cultivo celular	75

4	Quantificação de vírus	81
4.1	Diluição limitante	81
4.2	Ensaio de placa	81
4.3	Outros métodos de quantificação	83
5	Identificação e caracterização de um isolado	84
5.1	Sensibilidade a solventes orgânicos	84
5.2	Concentração e purificação por ultracentrifugação	84
6	Biossegurança laboratorial	85
7	Bibliografia consultada	86

1 Introdução

Os grandes avanços no entendimento dos mecanismos de replicação, transmissão e patogênica de vários agentes virais somente foram possíveis após o desenvolvimento de métodos de propagação e detecção de vírus *in vitro*. No princípio da Virologia, antes mesmo da classificação dos vírus como agentes filtráveis, as alterações produzidas nos animais durante as infecções virais já eram observadas e descritas. No entanto, a falta de conhecimentos sobre o agente e de equipamentos adequados fez com que a diferenciação entre as infecções fosse realizada apenas entre as enfermidades com sinais clínicos característicos. Inicialmente, o único método de propagação viral era a inoculação em animais susceptíveis. Embora essa forma de amplificação viral tenha sido muito útil nos primórdios da Virologia, esse método de amplificação restringiu o estudo dos vírus devido à dificuldade de manutenção de animais e também pela baixa reprodutibilidade da maioria das enfermidades víricas.

A maior revolução na Virologia ocorreu após o advento dos antibióticos, o que possibilitou o estabelecimento de cultivos celulares livres de contaminantes bacterianos. O uso dos cultivos celulares contribuiu de maneira decisiva para a detecção e multiplicação dos vírus com diversas finalidades, viabilizando o diagnóstico, estudos bioquímicos e moleculares e produção de vacinas. Nesse sentido, a citopatologia, produzida por alguns vírus em células de cultivo durante a sua replicação, é uma característica amplamente utilizada para demonstrar a presença do agente em material clínico, permitindo a realização do diagnóstico.

As técnicas de detecção viral foram desenvolvidas inicialmente com fins diagnóstico, ou seja, para pesquisar vírus em amostras clínicas; porém passaram a ser utilizadas para uma ampla gama de finalidades em laboratórios de virologia.

A confirmação da presença do vírus em tecidos, secreções ou excreções pode ser realizada pelo uso de técnicas que demonstrem o agente, o efeito da replicação em cultivo celular, produtos intermediários do processo replicativo (proteínas, corpúsculos de inclusão) ou o material genético (DNA ou RNA viral). Muitas vezes recorre-se à

realização de duas ou mais técnicas para a confirmação definitiva da presença do agente. A escolha de uma determinada técnica de detecção está diretamente relacionada com a forma de infecção e com o tropismo do vírus por determinados tecidos e órgãos. Por outro lado, a disponibilidade de equipamentos, qualidade dos reagentes e de pessoal capacitado para a execução das técnicas também podem determinar a escolha da técnica a ser empregada. A simples detecção do agente viral em uma amostra clínica deve ser considerada com cautela, pois a sua presença pode não ser um indicativo seguro da etiologia da doença.

Os métodos de detecção dos agentes virais podem ser divididos em métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos compreendem as técnicas em que o agente viral é diretamente detectado, ou seja, a partícula viral é observada e identificada de maneira precisa. A única técnica que se enquadra nesse princípio é a microscopia eletrônica. Os métodos de detecção indireta identificam as propriedades biológicas ou produtos resultantes da replicação viral, como proteínas ou ácidos nucleicos. Neste capítulo, serão apresentadas e discutidas as técnicas utilizadas para a detecção de partículas víricas, proteínas ou material genético viral. A aplicação dessas técnicas, com finalidades diagnósticas, será abordada no Capítulo 11. Além disso, serão abordadas as maneiras de multiplicação, quantificação e caracterização viral, bem como alguns aspectos de segurança laboratorial.

2 Métodos de detecção e identificação de vírus

2.1 Detecção direta por microscopia eletrônica

A maioria dos agentes virais possui partículas víricas com características morfológicas e estruturais peculiares às famílias as quais pertencem. Com base nesse aspecto, o método mais simples de detecção e identificação de vírus é a visualização direta das partículas na amostra (Figura 3.1). Exemplos clássicos do uso da microscopia eletrônica (ME) com fins diagnósticos incluem a detecção de partículas víricas em crostas de lesões causadas pelo ectima contagioso dos ovinos

e pseudo-varíola bovina (parapoxvírus) ou, ainda, a detecção do parvovírus em fezes caninas e

rotavírus ou coronavírus em fezes de bezerros com diarreia.

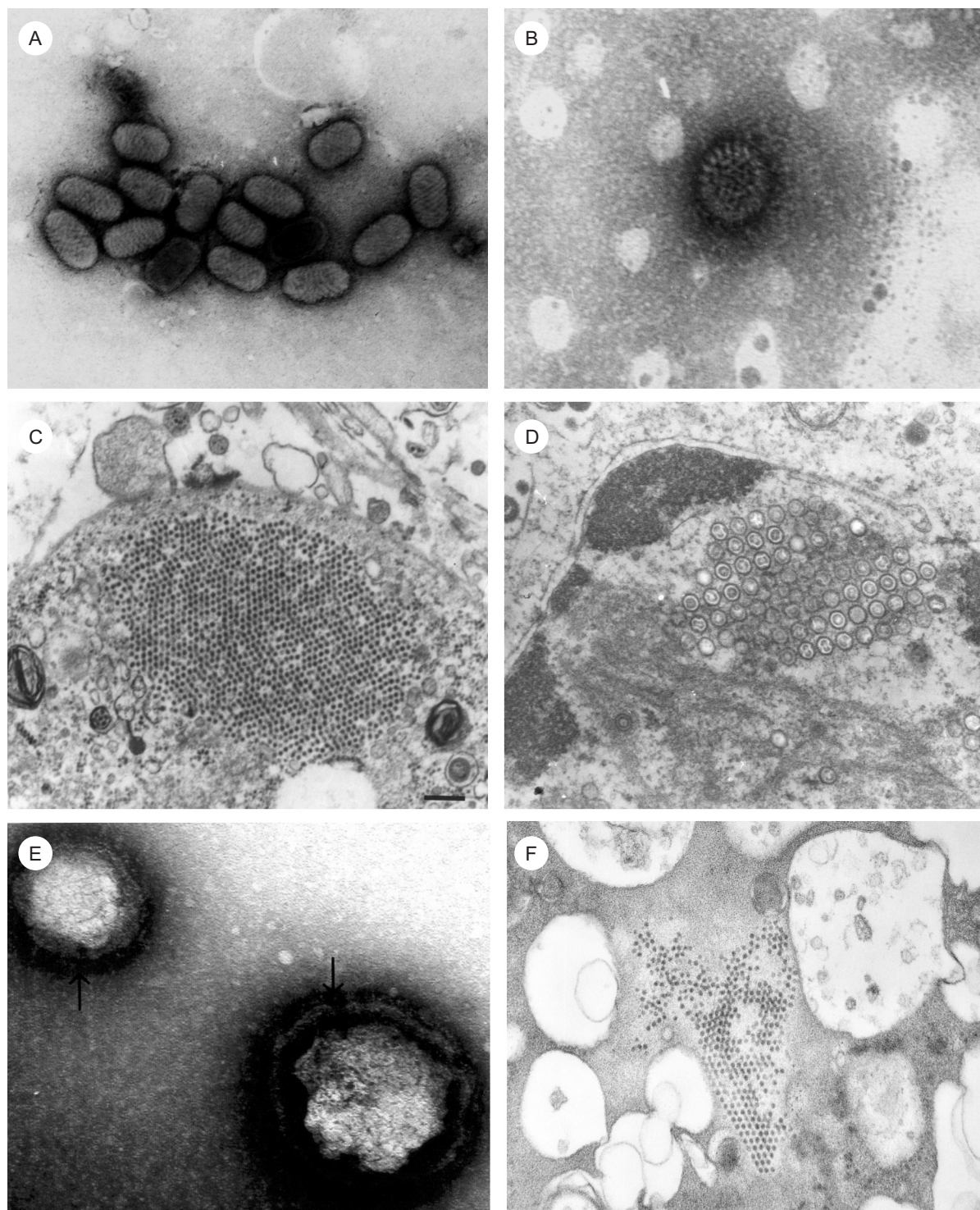


Figura 3.1. Microscopia eletrônica. (A) Partículas de parapoxvírus em material coletado de lesões de ovinos suspeitos de ectima contagioso (50.000x); (B) Partículas típicas de rotavírus em fezes bovinas diarréicas (260.000x); (C) Partículas características de calicivírus em células de cultivo, inoculadas com secreção nasal de um felino com doença respiratória (40.000x); (D) Partículas típicas de herpesvírus no núcleo de células de cultivo, inoculadas com material coletado de um touro com balanopostite (48.000x); (E) Partículas do vírus da parainfluenza bovina 3 (bPI-3), observadas em sobrenadante de cultivo celular (260.000x); (F) Arranjo cristalino de partículas típicas de picornavírus no citoplasma de células de cultivo, inoculadas com material coletado de um bovino com doença gastrentérica e respiratória (315.000x).

A ME possuiu grande aplicabilidade na pesquisa e identificação de vírus que não replicam com eficiência em cultivo celular. Essa técnica permitiu a identificação de vários agentes entéricos de difícil cultivo, tais como: poxvírus, rotavírus, calicivírus, astrovírus, entre outros. Quando as partículas víricas estão presentes em grande quantidade, são facilmente observadas nas fezes de animais com diarreia ou em líquidos vesiculares de infecções cutâneas.

A maior restrição da ME é a sua baixa sensibilidade. Amostras clínicas que contenham quantidade inferior a 10^6 - 10^7 partículas víricas por mililitro não são detectadas como positivas por essa técnica, gerando resultados falso-negativos. Essa quantidade de vírus é geralmente encontrada em fluidos vesiculares e fezes, o que não ocorre com tanta frequência em secreções respiratórias. A sensibilidade, no entanto, não é o único limitante dessa técnica. O custo elevado do equipamento e a exigência de técnicos altamente capacitados para a operação e interpretação dos resultados também representam limitações. O período necessário para a obtenção dos resultados varia entre 15 minutos, nos casos em que o material é observado diretamente no microscópio, até alguns dias quando há necessidade do processamento prévio da amostra para aumentar a possibilidade de detecção. Pode-se também realizar a ME em células de cultivo previamente inoculadas com o material suspeito.

A sensibilidade da ME pode ser aumentada pelo uso de técnicas que permitam a concentração e facilitem a visualização das partículas víricas. A clarificação de amostras por centrifugação de baixa rotação é empregada para remover partículas e substâncias que possam interferir na técnica. A ultracentrifugação é utilizada com o objetivo de concentrar as partículas virais. A aglutinação com soro hiperimune é rotineiramente utilizada e denomina-se imunoeletromicroscopia. Nesta metodologia, utiliza-se um soro hiperimune específico contra o agente suspeito, cujos anticorpos irão se ligar e promover a concentração das partículas, facilitando a visualização. Anticorpos marcados com micropartículas de ouro (técnica de *imunogold*) também são utilizados para au-

mentar a sensibilidade do teste. Após o processo de clarificação e concentração, a amostra é corada negativamente, geralmente com tungstênio, e examinada sob ME.

Além do seu uso em diagnóstico, a ME tem sido utilizada para o estudo da morfologia e ultra-estrutura de partículas víricas e também em estudos de patogenia. As características observadas para a identificação e caracterização do agente são: o diâmetro dos vírions, morfologia do nucleocapsídeo, presença ou não de envelope, presença de projeções na superfície das partículas, organização dos agregados de partículas e a localização celular dos vírions.

2.2 Detecção de propriedades biológicas dos vírus

2.2.1 Hemaglutinação

Vários vírus possuem proteínas de superfície que se ligam a eritrócitos, provocando a sua agregação e aglutinação, fenômeno denominado *hemaglutinação* (HA) (Tabela 3.1). A propriedade de aglutinar eritrócitos é restrita a algumas famílias de vírus (exemplos: ortomixovírus e paramixovírus) e, para cada um desses vírus, a HA ocorre apenas com eritrócitos de determinadas espécies animais. Nos vírus da influenza, por exemplo, a ligação entre a proteína do envelope viral (hemaglutinina ou HA) com o ácido N-acetilneuramínico da membrana dos eritrócitos de galinha é a responsável pela aglutinação. Baseando-se nesse princípio, a técnica de HA pode ser utilizada para a detecção dos vírus que possuem essa propriedade biológica. O teste é realizado pela incubação de uma suspensão de eritrócitos com o material suspeito (puro ou em diluições) em microplacas com fundo em “V” ou “U”. Após o período de incubação, a presença do agente hemaglutinante será indicada pela formação de uma rede difusa de eritrócitos no poço. Em amostras negativas (ausência do agente hemaglutinante), as hemácias não serão aglutinadas, irão rolar e se acumular no fundo da cavidade, formando um botão bem definido (Figura 3.2). Esse teste é de fácil execução, porém falha em detectar quan-

Tabela 3.1. Vírus com atividade hemaglutinante sobre eritrócitos animais

	Vírus	Fonte de vírus	Eritrócitos (espécie)
BOVINOS	Adenovírus bovino (BAdV)	Sobrenadante de cultivo celular	Rato, bovino ou macacos rhesus
	Coronavírus bovino (BoCV)	Amostras fecais e sobrenadante de cultivo celular	Camundongo, hamster e rato
	Parainfluenza 3 bovino (bPI-3)	Sobrenadante de cultivo celular	Bovino e cobaia
EQÜINOS	Encefalomielite eqüina (EEEV, WEEV)	Macerado de cérebro de camundongo	Ganso ou pinto de 1 dia
	Influenza eqüina	Sobrenadante de cultivo celular ou líquido amniótico	Galinha e cobaia
	Adenovírus eqüino (EAdV)	Sobrenadante de cultivo celular	Rato ou macaco rhesus
	Encefalite japonesa (JEV)	Suspensão de cérebro de camundongo	Ganso ou pinto de 1 dia
SUÍNOS	Peste suína africana (ASFV)	Sobrenadante de cultivo celular	Suíno
	Encefalomielite hemaglutinante dos suínos	Sobrenadante de cultivo celular	Galinha, rato, camundongo e hamster
	Influenza suína (SIV)	Fluido alantóide	Galinha
	Parvovírus suíno (PPV)	Extratos de tecidos fetais ou sobrenadante de cultivo celular	Humano, macaco, camundongo, cobaia, gato, galinha e rato
CANINOS e FELINOS	Adenovírus canino (CAdV)	Sobrenadante de cultivo celular	Rato, macaco rhesus, humano e aves
	Parvovírus canino (CPV)	Amostras fecais ou sobrenadante de cultivo	Suíno ou macaco rhesus
	Panleucopenia felina (FPLV)	Amostras fecais ou sobrenadante de cultivo	Suíno ou macaco rhesus
AVES	Influenza aviária (AIV)	Fluido alantóide	Mamíferos e aves
	Doença de Newcastle (NDV)	Fluido alantóide	Galinha
	Bronquite infecciosa aviária (IBV)	Fluido corioalantóide	Galinha
LEPORINO	Doença hemorrágica dos coelhos (RHDV)	Suspensão de tecidos e sobrenadante de cultivo	Humano do tipo O

tidades pequenas de vírus. Outra restrição é que a atividade hemaglutinante é uma propriedade restrita a algumas famílias de vírus, ou seja, a técnica não possui aplicação universal.

A atividade hemaglutinante pode ser inibida pela presença de anticorpos anti-hemaglutininas específicos. Os anticorpos específicos irão ligar-se à proteína hemaglutinante do vírus, impedindo a ligação desta com os eritrócitos. Dessa maneira, um método para se detectar e quantificar anticor-

pos antivirais no soro de animais foi desenvolvido e denomina-se *inibição da hemaglutinação* (HI).

A técnica de HI pode ser utilizada tanto para a detecção de anticorpos antivirais como para a identificação de vírus hemaglutinantes. Após a detecção da atividade HA, a técnica de HI é realizada, utilizando-se um anti-soro específico contra o vírus suspeito para confirmar o diagnóstico. A aplicação desse método em diagnóstico será abordada com detalhes no Capítulo 11.

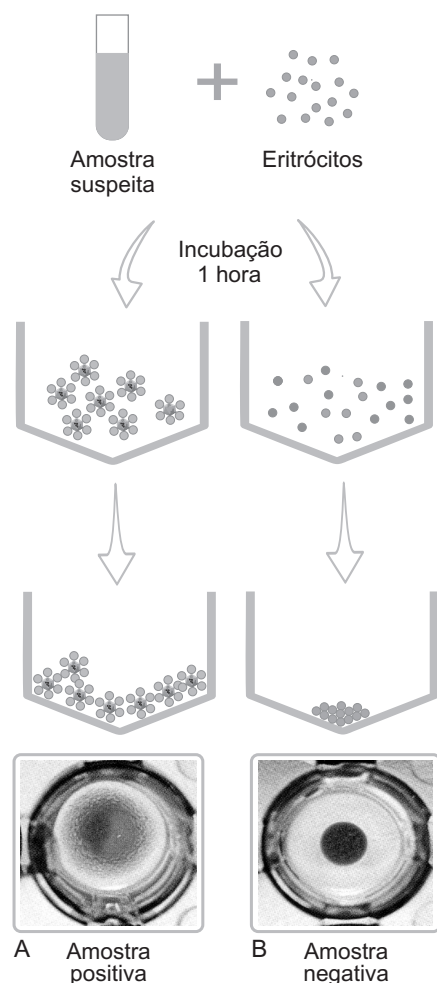


Figura 3.2. Teste de hemaglutinação (HA) para a pesquisa de vírus. A amostra suspeita de conter o vírus é misturada com uma suspensão de eritrócitos e incubada a 37 °C por 1 hora. (A). A presença do vírus é indicada pela aglutinação dos eritrócitos e formação de uma rede fina difusa no fundo da cavidade; (B). Na ausência do vírus, os eritrócitos rolam para o fundo da cavidade, formando um botão de contorno bem definido.

2.2.2 Hemadsorção

Durante o ciclo replicativo de alguns vírus em cultivo celular, determinadas proteínas virais são expostas na superfície das células infectadas. Algumas dessas proteínas possuem a capacidade de se ligar a eritrócitos quando esses são adicionados ao meio de cultivo. Esse processo é denominado *hemadsorção* (HAD), e é restrito à interação de alguns vírus com eritrócitos de certas espécies de mamíferos e aves. A HAD é um indicativo da presença desses vírus no material suspeito. Essa técnica é de simples execução, sendo empregada

para a detecção de ortomixovírus, paramixovírus e asfarvírus.

2.3 Detecção de antígenos virais

2.3.1 Imunofluorescência

A imunofluorescência (IFA) é uma técnica de detecção de antígenos e baseia-se na reação de anticorpos específicos com o antígeno presente no material suspeito. Os anticorpos são conjugados com uma substância que emite luminosidade fluorescente (fluoresceína) quando exposta à luz ultravioleta (UV). A presença do antígeno no material é revelada pela emissão de luminosidade fluorescente. Essa metodologia pode ser aplicada em monocamada de células, em esfregaços celulares, em tecidos frescos, congelados ou incluídos em parafina. Geralmente, o material deve ser previamente fixado em etanol, metanol ou acetona. Após a fixação, incuba-se o material com o anticorpo específico marcado com o fluorocromo (FITC – isotiocianato de fluoresceína ou *Texas Red*). Posteriormente, sucessivas lavagens são realizadas para a remoção do anticorpo não-ligado. O material é, então, examinado ao microscópio de luz UV. A coloração verde-maçã ou vermelha (para anticorpos marcados com FITC e *Texas Red*, respectivamente), visualizada contra um fundo escuro, indica a presença de antígenos virais na amostra. A emissão de fluorescência resulta da excitação do fluorocromo conjugado ao anticorpo quando exposto à luz UV. O resultado final é a observação de uma região ou de toda a célula corada, pois as proteínas virais estão dispersas no seu interior (Figura 3.3).

Existem basicamente duas variantes da técnica: a imunofluorescência direta (IFD) e a indireta (IFI). Na IFD, o anticorpo primário (monoclonal ou policlonal) específico para o agente é marcado com o fluorocromo e adicionado diretamente sobre a amostra. No caso da IFI, a técnica é realizada em duas etapas. A primeira incubação é realizada com o anticorpo primário específico para os antígenos virais e, após a remoção dos anticorpos que não se ligaram aos antígenos, por sucessivas lavagens, adiciona-se o anticorpo secundário, marcado com o fluorocromo. O anti-

corpo secundário (específico para a espécie animal na qual foi produzido o anticorpo primário) reconhece e se liga ao anticorpo primário.

A IFA é uma técnica simples e se constitui em uma das técnicas mais utilizadas em Virologia, possuindo diversas aplicações, incluindo o diagnóstico de infecções víricas. A aplicação dessa técnica em diagnóstico será abordada no Capítulo 11. Como desvantagens, incluem-se a necessidade de um microscópio de luz UV e a possibilidade de alguns tecidos ou células emitirem fluorescência natural, o que pode dificultar a interpretação do resultado.

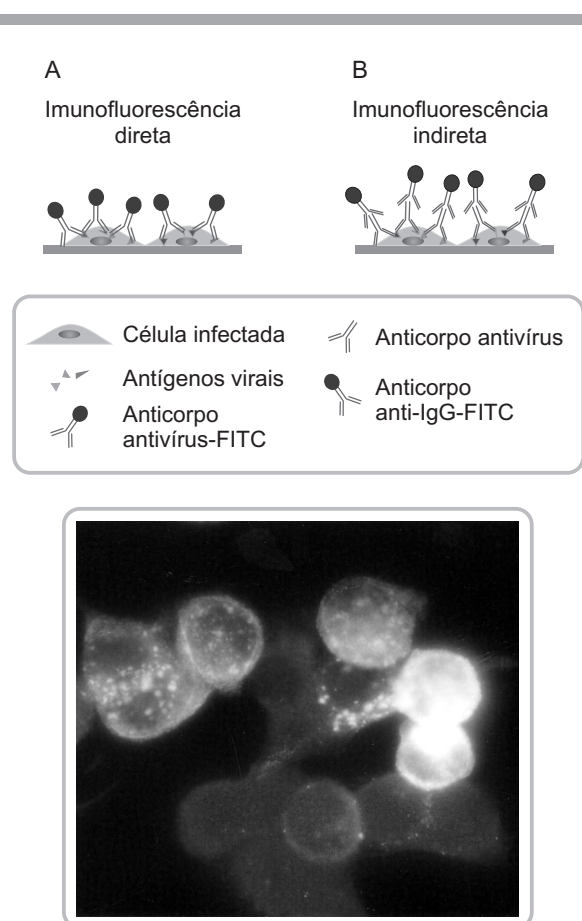


Figura 3.3. Ilustração demonstrativa da técnica de imunofluorescência para a detecção de antígenos virais em células. (A) Imunofluorescência direta (IFD); (B) Imunofluorescência indireta (IFI).

2.3.2 Imunoperoxidase

A técnica de imunoperoxidase (IPX) baseia-se no mesmo princípio da IFA, com a diferença que os anticorpos são marcados com uma enzima, que pode ser a *horseradish peroxidase* (HRPO

ou peroxidase) ou a fosfatase alcalina (AP). O termo IPX tem sido utilizado quase como sinônimo, embora deva ser ressaltado que essa não é a única enzima utilizada na técnica. Essa técnica pode ser aplicada em monocamadas celulares, esfregaços ou diretamente em tecidos, sendo denominada de imunocitoquímica (ICQ) ou imunistoquímica (IHC), respectivamente. A metodologia é semelhante à IFA, existindo também a IPX direta e indireta. Na IPX direta, o material fixado é incubado com o anticorpo antiviral marcado com a enzima, seguido da lavagem e adição do substrato. A presença do antígeno no material é revelada pela ação da enzima no substrato. Utilizam-se substratos cromogênicos (aminoetilcarbazol – AEC; diaminobenzidina – DAB; ou 4-cloronaftol) que produzem uma coloração marrom ou marrom-carmim pela ação da enzima e formam um precipitado na célula positiva (Figura 3.4). A IPX indireta utiliza o anticorpo primário específico para o antígeno, e o anticorpo secundário é marcado com a enzima. Essa variação da

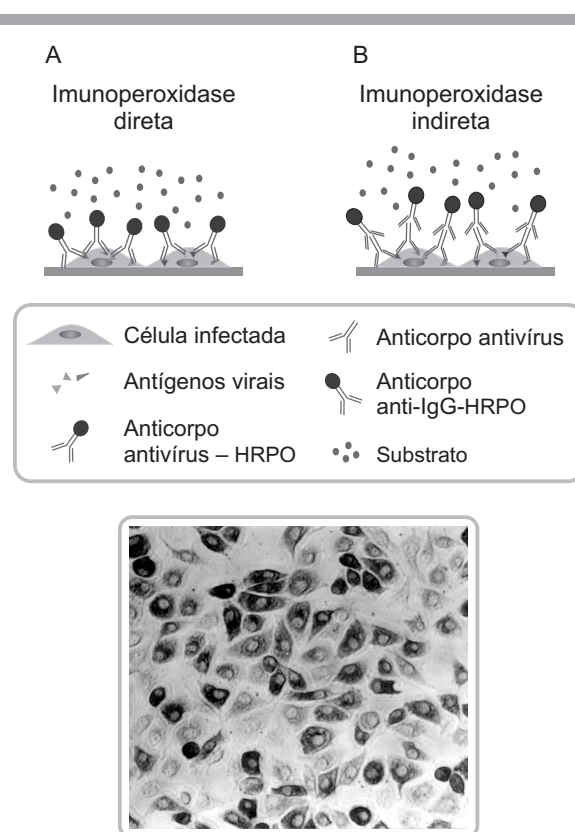


Figura 3.4. Ilustração demonstrativa da técnica de imunoperoxidase (IPX) para a detecção de antígenos virais em células. (A). Imunoperoxidase direta; (B) Imunoperoxidase indireta.

técnica apresenta maior sensibilidade devido à amplificação do sinal. A técnica de IPX possui as mesmas aplicações da IFA, porém apresenta a vantagem de não necessitar do microscópio de luz UV, já que as reações podem ser visualizadas sob microscopia ótica comum.

2.3.3 Ensaio imunoenzimático

O teste imunoenzimático (ELISA) pode ser utilizado para a detecção de antígenos virais e também de anticorpos. É uma técnica que apresenta vantagens, tais como: a boa sensibilidade, especificidade, baixo custo, repetibilidade e versatilidade. Em alguns casos, o uso da técnica permite a detecção de até 1 ng (nanograma) de antígeno por grama de tecido coletado diretamente do animal. Os testes podem ser executados em amostras individuais, como recurso diagnóstico em clínicas ou consultórios; ou em grande escala, como realizado em laboratórios totalmente automatizados. A técnica permite uma variação de formas e aplicações, dependendo do objetivo e da disponibilidade de reagentes. Basicamente, os testes de ELISA podem ser classificados em diretos, indiretos ou de competição.

A técnica baseia-se na imobilização da reação antígeno-anticorpo em um suporte sólido (placas de poliestireno), seguida de uma reação colorimétrica. Por se tratar de uma técnica que apresenta inúmeras variações, neste capítulo será apresentado apenas o fundamento geral da técnica. Para um detalhamento maior, recomenda-se a literatura específica.

Um exemplo simplificado para facilitar o entendimento da técnica será brevemente descrito. No ELISA de captura direto (Figura 3.5) para detecção de antígenos virais, placas de 96 cavidades são recobertas com anticorpos específicos para um determinado agente. A amostra suspeita da presença viral (sangue, secreções ou leite) é adicionada e incubada por um determinado tempo. Nesse período, ocorre a captura do antígeno (amostras positivas) pelo anticorpo fixado na placa. Após essa etapa, são realizadas lavagens para a remoção de substâncias inespecíficas. A seguir adiciona-se um segundo anticorpo, específico

para o vírus, conjugado com a enzima (HRPO ou AP). Novamente os anticorpos que não se ligaram são removidos por lavagens. A confirmação da presença do antígeno viral é evidenciada pela adição de substrato e desenvolvimento da coloração específica nas amostras negativas. A leitura é realizada pela inspeção visual ou pelo uso de fotolorímetro.

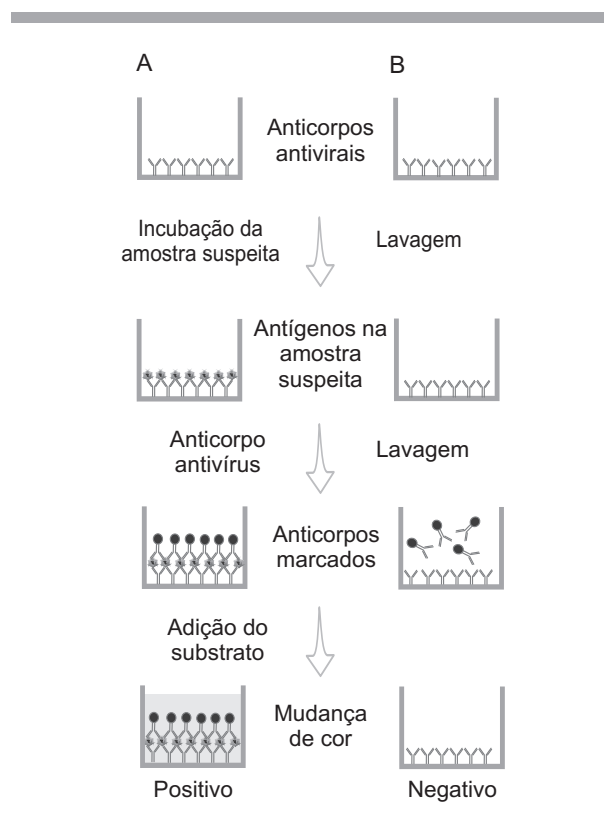


Figura 3.5. Ilustração demonstrativa do ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de antígenos. (A) Amostra positiva; (B) Amostra negativa.

2.3.4 Radioimunoensaio

O método de radioimunoensaio (RIA) de detecção de antígenos foi muito utilizado antes do surgimento dos testes de ELISA. A diferença básica entre os dois métodos reside no tipo de marcação utilizada. Na RIA, utiliza-se um isótopo radioativo em vez de enzima. O método é muito sensível e pode ser automatizado, porém os equipamentos requeridos são caros. A principal restrição do teste refere-se ao uso de substâncias radioativas e ao descarte dos reagentes. Dessa forma, a técnica encontra-se em desuso progressivo.

2.3.5 Imunocromatografia

A imunocromatografia é uma técnica de visualização simples, geralmente realizada em dispositivos plásticos, podendo ser executada em clínicas e ambulatorios. A prova é baseada na reação antígeno-anticorpo, em que a amostra suspeita (vírus ou antígenos virais) é passada através de um filtro e, então, impregnada em uma membrana, onde reagirá com o anticorpo específico previamente imobilizado. A presença do antígeno é revelada pelo aparecimento de focos ou bandas coloridas, pois os reagentes são conjugados com substâncias cromógenas. O resultado depende essencialmente da qualidade dos reagentes. Um dos problemas do teste é o seu custo elevado. Vários testes diagnósticos são baseados nesse princípio (Capítulo 11).

2.3.6 Aglutinação em látex

O ensaio de aglutinação em látex provavelmente seja o método mais simples de detecção de antígenos virais. O princípio da técnica baseia-se na mistura do material suspeito com anticorpos previamente adsorvidos a partículas de látex. A presença do antígeno resultará na sua ligação aos anticorpos e na aglutinação das partículas. A leitura da reação é visual e pode ser realizada imediatamente após a sua execução. Esta técnica tem aceitação por pequenos laboratórios e entre técnicos de campo. As suas principais restrições referem-se à baixa sensibilidade e especificidade. Por isso, resultados falso-negativos são frequentes, a não ser que grandes quantidades de antígenos estejam presentes no material suspeito. A resolução dos problemas de sensibilidade e especificidade pode aumentar a sua aplicabilidade.

2.3.7 Imunodifusão em ágar

O teste de IDGA foi desenvolvido para a detecção de antígenos, porém tem sido mais utilizado para a detecção de anticorpos. A prova é baseada na precipitação de complexos antígeno-anticorpos em gel de ágar. O ensaio é realizado pela adição da amostra suspeita e do soro controle em orifícios em posições opostas em uma

matriz de ágar. As amostras difundem-se radialmente pelo gel e, ao se encontrarem, proporcionam a reação antígeno-anticorpo, seguida da insolubilização e precipitação. A precipitação deste complexo forma linhas opacas no gel (linhas de precipitação), que podem ser visualizadas a olho nu, com o auxílio de uma fonte de luz (ver Figura 11.9, no Capítulo 11). A IDGA é uma técnica bastante difundida para a detecção de anticorpos, porém sem muita aplicabilidade para a detecção de antígenos ou partículas víricas.

2.3.8 Immunoblots

O princípio dos *immunoblots* é semelhante ao da IPX. Os antígenos virais são detectados pelo uso de anticorpos marcados com enzimas, que agem no substrato, provocando mudança de cor. A diferença fundamental entre a IPX e os *immunoblots* é que o material suspeito deve ser previamente solubilizado e imobilizado em um suporte sólido, geralmente membranas de nitrocelulose ou nylon. A membrana é, então, incubada com o anticorpo antiviral não-marcado (anticorpo primário), seguido de lavagem e incubação com um anticorpo antiespécie do anticorpo primário (anticorpo secundário) conjugado a uma enzima. A presença do antígeno pesquisado é revelada pela adição do substrato, que muda de coloração pela ação da enzima. Substratos que emitem luminosidade capturável em filmes de raios X também têm sido utilizados e aumentam a sensibilidade da técnica (Figura 3.6).

Existem duas variações principais dos *immunoblots*: os *dot/slot blots* e o *Western blot* (WB). No *dot/slot blot*, o homogenado de proteínas é diretamente imobilizado na membrana, em pontos (*dots*) ou fendas (*slots*), seguida pela detecção com os anticorpos. Essa variação da técnica é mais simples e rápida, porém não fornece informações acerca da massa da proteína detectada. No WB, as proteínas solubilizadas são separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidas para a membrana e, então, submetidas à detecção com os anticorpos marcados. Essa técnica permite a detecção da proteína e também a determinação de sua massa molecular, pelo padrão de migração no gel.

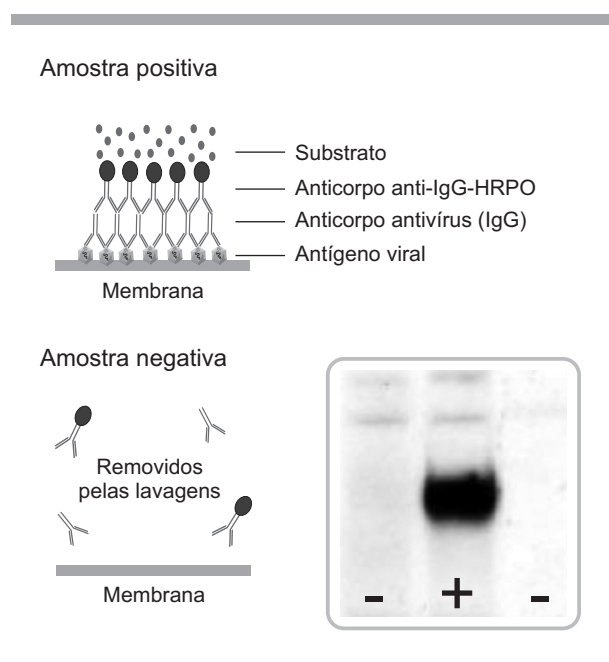


Figura 3.6. Western blot para a detecção de proteínas virais. Os antígenos são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidos e imobilizados em uma membrana de nitrocelulose. A membrana é incubada com o anticorpo primário (anti-antígeno) e subsequentemente com o anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase. A presença do antígeno é revelada pela ação da enzima no substrato que resulta na marcação do filme de raios X no local correspondente à migração da proteína-alvo.

2.4 Detecção/identificação de ácidos nucléicos

As seqüências únicas de nucleotídeos do genoma dos vírus, associadas com técnicas de amplificação e hibridização de ácidos nucléicos, proporcionaram o desenvolvimento de metodologias para a detecção e identificação de agentes virais em uma variedade de amostras. As técnicas de hibridização e a reação em cadeia da polimerase (PCR) tornaram-se muito úteis para a detecção e identificação de agentes virais e impulsionaram os estudos da biologia molecular desses agentes. A disponibilidade das seqüências genômicas dos vírus em bancos de dados possibilitou a identificação de regiões conservadas, viabilizando a síntese de *primers* e de sondas, utilizadas nas técnicas de PCR e hibridização, respectivamente. A interpretação dos resultados dessas técnicas, principalmente quando utilizadas com fins diag-

nósticos, deve ser realizada com cautela. O resultado positivo pode não significar necessariamente a associação do agente suspeito com a doença em questão. O material genético de agentes que produzem infecções latentes, como os herpesvírus, pode ser detectado sem que os agentes estejam, necessariamente, associados com a enfermidade em questão.

A detecção de ácidos nucléicos possui aplicação especial para os vírus de difícil adaptação ao cultivo celular; casos em que o material suspeito contenha pequenas quantidades do agente, que esteja com viabilidade comprometida por problemas de conservação e em estudos retrospectivos. Essas técnicas também possuem aplicações importantes na detecção de infecções latentes, quando o único indicador da infecção é a presença do genoma do agente.

2.4.1 Técnicas de hibridização (Southern/Northern blot)

A detecção de ácidos nucléicos virais pelo uso de sondas marcadas com isótopos radioativos ou com enzimas tem sido muito utilizada em Virologia, tanto em diagnóstico como em pesquisa. A técnica baseia-se na complementaridade das moléculas de DNA ou RNA. Inicialmente, escolhe-se a região-alvo do genoma a ser detectado, que deve ser um segmento conservado entre isolados de campo. A sonda deve ser sintetizada com base na seqüência de nucleotídeos da região-alvo e deve ser exatamente complementar a esta. Essa sonda pode ser um oligonucleotídeo sintético, um segmento de DNA inserido em um plasmídeo ou um produto de PCR. A sonda é, então, conjugada com um isótopo radioativo ou com uma enzima, para possibilitar a sua detecção. O material suspeito é imobilizado em uma membrana, seguido pela incubação com a sonda marcada e de lavagens para remover as sondas não-ligadas. Na presença do ácido nucléico do vírus suspeito, a sonda irá hibridizar com a seqüência-alvo. A presença da sonda revela-se pela exposição da membrana a um filme de raios X ou pela adição de substrato (Figura 3.7).

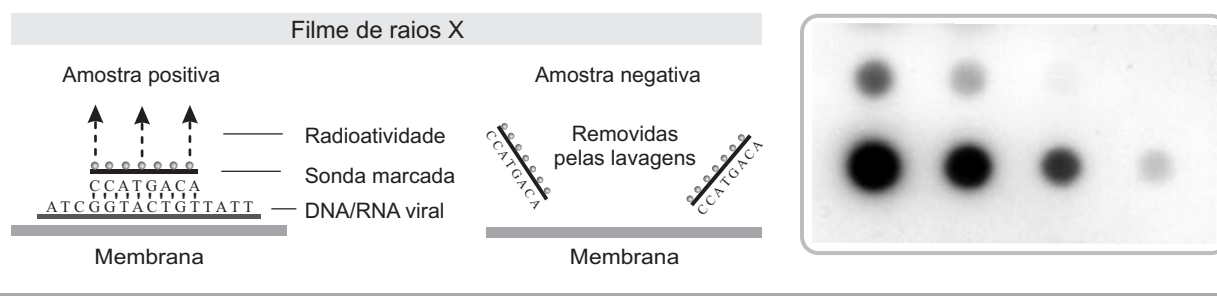


Figura 3.7. Técnica de hibridização de ácidos nucleicos (dot blot). O material genético do vírus é extraído de tecidos e imobilizado em áreas de uma membrana. Posteriormente a membrana é incubada com uma sonda com sequência de nucleotídeos complementar ao DNA do vírus, marcada com uma substância radioativa. A presença do DNA viral é revelada pela marcação do filme de raios X pela emissão radioativa da sonda.

A técnica de hibridização possui variações de acordo com o ácido nucleico a ser detectado e com a forma como o material é imobilizado na membrana. Quando o ácido nucleico (DNA, RNA) é imobilizado diretamente na membrana, a técnica é denominada *dot* ou *slot blot*. A presença do ácido nucleico será demonstrada pelo aparecimento de uma marca ou borrão no local onde foi aplicado o material. Porém, se o material for previamente submetido à eletroforese, para a separação das moléculas de ácido nucleico de acordo com o tamanho, e então transferido para a membrana, a técnica denomina-se *Southern blot* (para DNA) ou *Northern blot* (para RNA). A reação positiva aparece na forma de bandas marcadas na membrana, correspondentes à migração do ácido nucleico durante a eletroforese. Em razão da necessidade da eletroforese e transferência para a membrana, as técnicas de *Southern* e *Northern blot* são mais trabalhosas e demoradas, porém os resultados são mais informativos.

As técnicas de hibridização possuem boa sensibilidade e especificidade, e, quando implementadas na rotina do laboratório, permitem a obtenção dos resultados em poucos dias. Outra vantagem é que podem ser aplicadas a qualquer agente infeccioso, necessitando-se apenas de uma sonda específica. As restrições dessas técnicas referem-se à necessidade de pessoal especializado e à disponibilidade de reagentes.

2.4.2 Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* (ISH) detecta a presença do material genético do agente (DNA ou RNA) diretamente em cortes histológicos de tecidos.

Essa metodologia tem sido amplamente utilizada para a localização espacial e temporal da presença e expressão de determinados genes. Também é utilizada na identificação de agentes causadores de tumores. O princípio da técnica é o mesmo da anterior, porém o ácido nucleico é detectado diretamente nos cortes de tecido. A reação é revelada pelo uso de sondas marcadas com substâncias radioativas ou com proteínas que são, posteriormente, detectadas com o auxílio de anticorpos. As reações positivas podem ser visualizadas pela exposição a filmes radiográficos líquidos ou com uso de substâncias cromógenas, permitindo a localização e identificação das células infectadas. Devido ao fato de ser trabalhosa e demorada, a ISH não é utilizada na rotina laboratorial, sendo empregada em casos específicos, principalmente em estudos de patogenicidade.

2.4.3 Reação da polimerase em cadeia

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica altamente específica e sensível, que consiste na síntese *in vitro* de uma grande quantidade de cópias de um segmento de DNA existente na amostra. Ou seja, consiste em amplificar o número de moléculas a partir de uma molécula-alvo original, denominada *template* ou molde. Essa amplificação pode ser realizada a partir de uma quantidade mínima do ácido nucleico-alvo; uma PCR bem padronizada, teoricamente, é capaz de detectar e amplificar até uma única cópia do molde existente na amostra.

A região-alvo a ser amplificada é delimitada por *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos de aproximadamente 20 nucleotídeos. Esses *pri-*

mers hibridizam com suas regiões complementares, que se localizam nas cadeias opostas do DNA, nas regiões flangeadoras da sequência-alvo. Os *primers* são sintetizados de acordo com a sequência a ser amplificada, e a sua especificidade depende do seu grau de conservação e complementaridade com a sequência-alvo. A reação de PCR envolve a realização de vários ciclos (entre 30 e 40) de desnaturação (separação da fita dupla), hibridização dos *primers* e polimerização da cadeia de DNA a partir dos *primers*, pela enzima DNA polimerase. A cada ciclo o número de mo-

léculas correspondentes à sequência-alvo duplica e, no final da reação, acumulam-se milhões de cópias idênticas correspondentes à sequência-alvo inicial. Essas moléculas, denominadas genericamente de produtos de PCR (ou amplicons), podem, então, ser detectadas visualmente em géis de agarose, corados com brometo de etídio, sob luz UV (Figura 3.8). Os produtos de PCR podem também ter a sua identidade confirmada por hibridização com sondas específicas. Essa técnica tem tido inúmeros usos nos diversos campos da Biologia e Medicina.

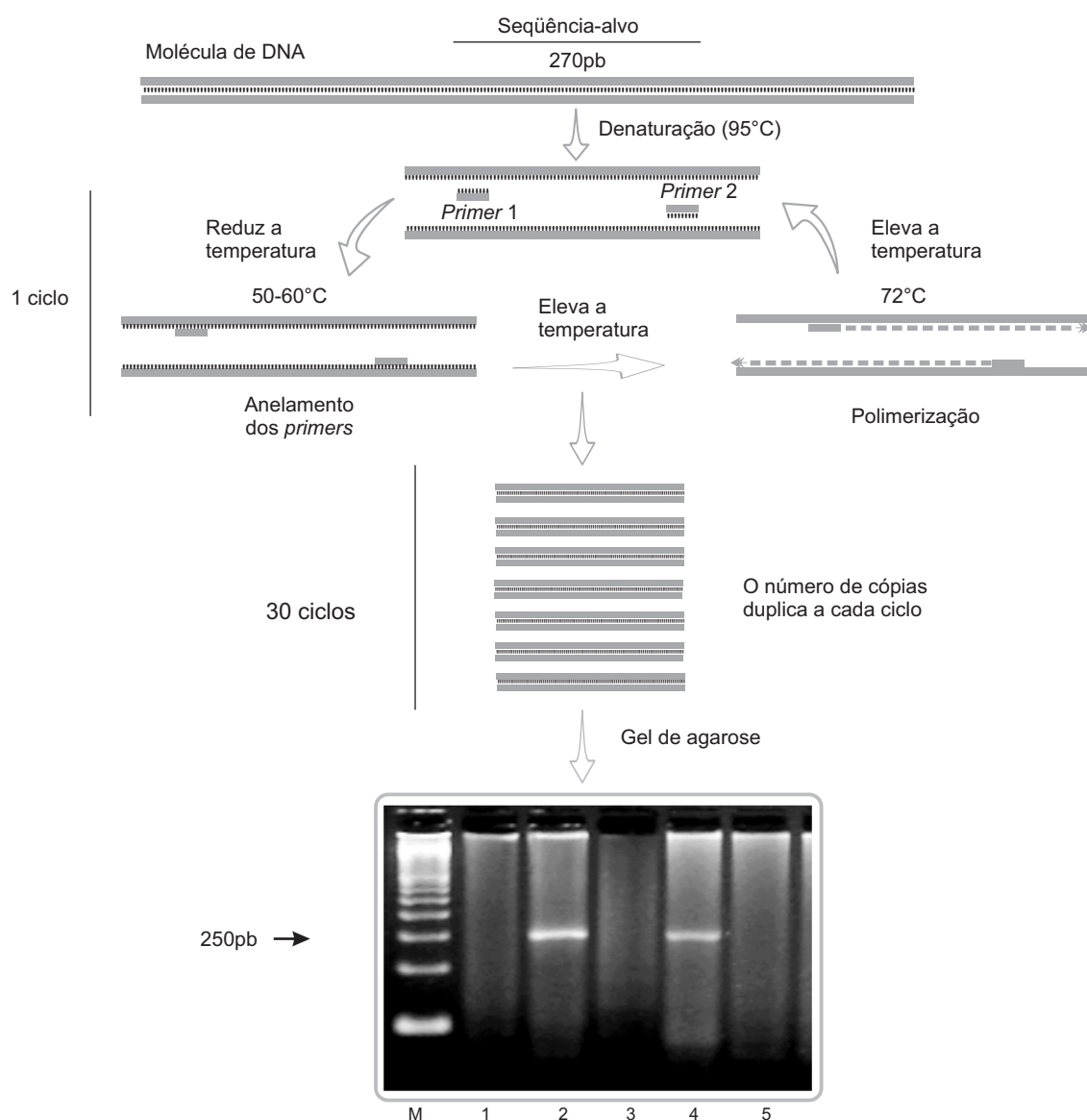


Figura 3.8. Ilustração demonstrativa da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A partir da molécula molde original (genoma viral), um segmento específico é amplificado por sucessivas etapas de síntese de DNA. O produto da amplificação pode ser visualizado sob luz UV em um gel de agarose corado com brometo de etídio, após migração por eletroforese. O tamanho dos produtos pode ser comparado com um marcador molecular de massa conhecida. (M) marcador molecular, (1) controle negativo, (2) controle positivo, (3, 4 e 5) amostras teste.

A grande difusão da PCR somente foi possível após a identificação de uma enzima polimerase de DNA resistente ao calor (*Taq* – *Thermophilus aquaticus*), o que levou à simplificação da técnica associado com o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais acessíveis. Essas novas tecnologias proporcionaram um domínio maior da técnica e o desenvolvimento de variações, como a *nested*-PCR, *multiplex*-PCR, RT-PCR e *real-time* PCR.

A *nested*-PCR é realizada em duas etapas. Na primeira etapa, um determinado segmento é amplificado pelo método tradicional. Uma segunda etapa é, então, realizada, utilizando-se o produto da primeira reação como molde e um outro conjunto de *primers*, complementares às seqüências localizadas internamente no produto da primeira reação. Com isso, uma seqüência interna do primeiro produto é reamplificada (Figura 3.9).

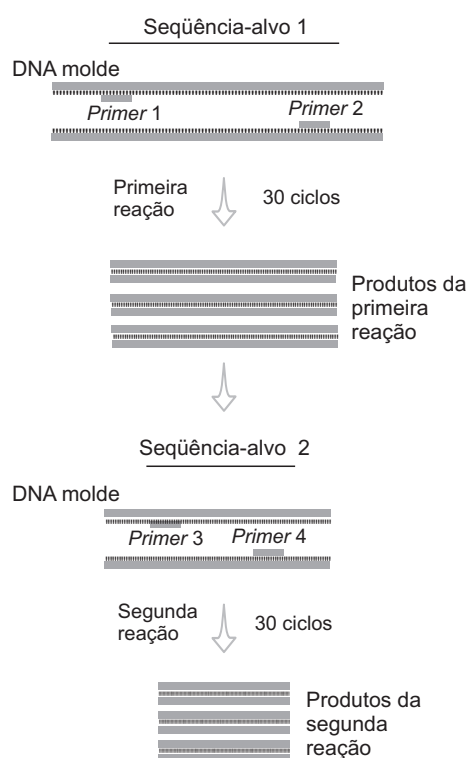


Figura 3.9. A reação de PCR-nested é realizada em duas etapas. Na primeira etapa, é utilizado um par de primers externos (1 e 2), que permitem a amplificação de um segmento do genoma viral (seqüência-alvo 1). A segunda etapa utiliza o produto da primeira reação como molde. Esta utiliza um par de primers internos (3 e 4), que permitem a amplificação de um segmento interno à seqüência inicial (seqüência-alvo 2). O PCR-nested é utilizado para aumentar a sensibilidade e especificidade da amplificação.

Em relação à PCR tradicional, a *nested*-PCR possui as vantagens de maior sensibilidade (duas etapas de amplificação) e especificidade. Uma variação dessa técnica é o *semi-nested* PCR, em que, na segunda reação, utiliza-se um *primer* interno e em conjunto com um dos *primers* da primeira reação.

O método da *multiplex*-PCR baseia-se na utilização de dois ou mais pares de *primers* na mesma reação. Cada conjunto de *primer* é específico para uma região do agente ou de diferentes agentes. Devido a sua versatilidade, essa técnica é utilizada para a busca de variantes do mesmo vírus ou no diagnóstico de enfermidades que podem ser causadas por diferentes agentes. Um exemplo é o diagnóstico de aborto em bovinos, quando é realizada uma reação com diferentes pares de *primers*, cada conjunto sendo específico para um dos agentes suspeitos.

A técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase* PCR) consiste na amplificação de segmentos de RNA. Através da transcrição reversa, realizada pela ação da enzima transcriptase reversa, uma cópia de DNA complementar (cDNA) é sintetizada a partir da RNA viral (genoma ou produto intermediário do processo de replicação). Essa nova molécula sintetizada será usada como *template* (molde) para a reação de PCR convencional. O desenvolvimento desta técnica proporcionou um grande avanço no estudo e diagnóstico dos vírus RNA.

O PCR em tempo real (*real time* PCR) é uma variação do PCR, com a capacidade de se detectar e quantificar a amplificação do produto à medida que vai sendo sintetizado. Essa técnica utiliza, além dos *primers*, uma sonda marcada com um fluorocromo. A sonda é complementar a uma região interna do produto e é marcada com uma substância fluorogênica. A cada ciclo de síntese, o fluorocromo é liberado da sonda e essa liberação é captada e medida na forma de intensidade luminosa. Esta técnica tem grande aplicabilidade quando a quantificação do ácido nucléico presente na amostra é necessária. Também possui aplicabilidade em diagnóstico de viroses de importância sanitária estratégica (exemplos: febre aftosa e peste suína clássica), pois permite a obtenção dos resultados em poucas horas.

2.4.5 Análise de restrição

Diferentes isolados de vírus podem ser identificados e distinguidos entre si pela análise dos fragmentos gerados pela clivagem de seus genomas por enzimas de restrição (endonucleases, Figura 3.10). Essas enzimas clivam o DNA em seqüências específicas, compostas por quatro a oito bases; a alteração em uma dessas bases al-

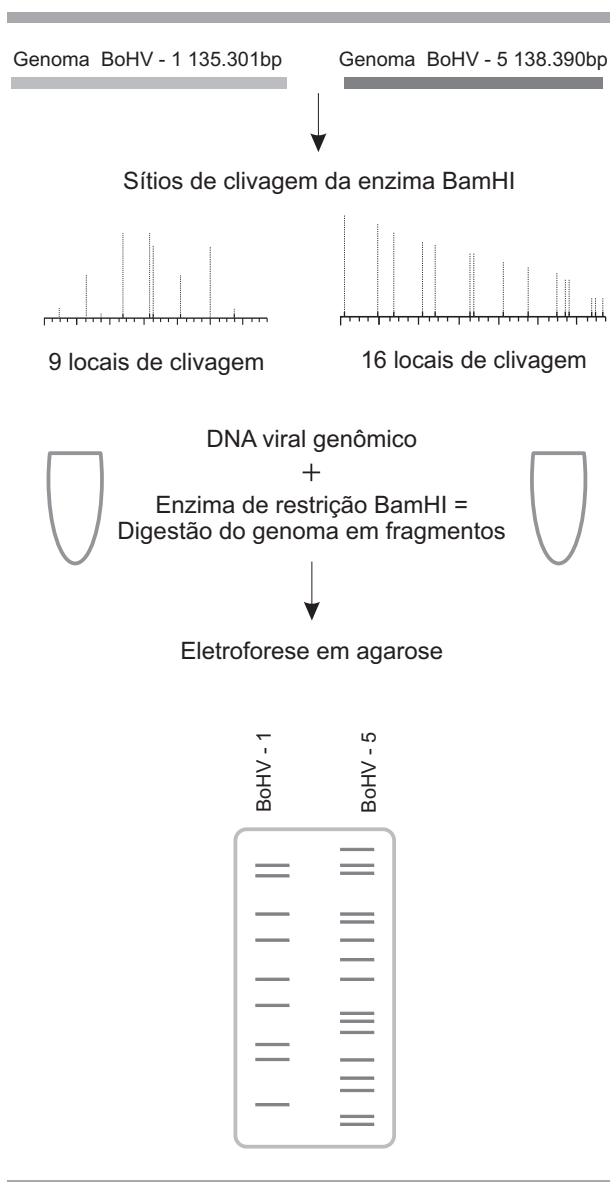


Figura 3.10. Ilustração demonstrativa da análise de restrição do genoma do herpesvírus bovino. A enzima BamHI reconhece e cliva o genoma do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em nove sítios (A) e o genoma do BoHV-5 em 16 locais (B). Os produtos da digestão são separados por eletroforese em agarose e visualizados sob luz UV. Os diferentes padrões de clivagem resultam em fragmentos de tamanho diferentes, cuja análise comparativa permite a identificação dos respectivos genomas. No exemplo acima, os locais de clivagem e o tamanho dos fragmentos são meramente ilustrativos.

tera o sítio e resulta em falha de clivagem. Assim, o genoma de um determinado vírus DNA é clivado com um conjunto de enzimas, produzindo um conjunto de fragmentos de determinados tamanhos. Outros isolados do vírus que possuam diferenças em quaisquer dos sítios de clivagem irão gerar padrões de clivagem distintos, podendo-se, assim, fazer a diferenciação entre isolados. A análise por restrição enzimática (REA) foi muito utilizada na classificação e caracterização de isolados de campo. Atualmente, o advento e difusão do seqüenciamento de DNA substituiu, com algumas vantagens, essa técnica, que se encontra restrita a alguns vírus ou em desuso.

2.4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), além de ser usada para separação de proteínas nos passos iniciais do WB, também é utilizada para a detecção do genoma e em estudos epidemiológicos de rotavírus, cujo genoma é composto por vários segmentos de RNA. Uma característica dos rotavírus é a presença de sorogrupos (ver Capítulo 30), que são correlacionados com diferenças na extensão desses segmentos. Essas diferenças irão produzir um padrão de migração na eletroforese, e isso será utilizado para a identificação do agente e classificação em sorogrupos. A metodologia consiste na extração do RNA a partir de fezes, separação dos fragmentos por SDS-PAGE e coloração do gel com nitrato de prata. Após a realização desse procedimento, as bandas correspondentes aos segmentos genômicos são analisadas, e os padrões de migração dos segmentos são comparados. O SDS-PAGE possui boa sensibilidade e especificidade quando comparado com outras técnicas de detecção dos rotavírus.

3 Multiplicação de vírus

A obtenção de vírus em grandes quantidades é essencial para diversos procedimentos virológicos. Após o seu isolamento, o vírus deve ser identificado e caracterizado. Para isso, deve ser amplificado a partir da amostra original. Quantidades consideráveis de vírus são necessárias

para a realização de testes sorológicos (soro-neutralização – SN, HI), produção de antígenos para a imunização de animais (obtenção de anti-soros ou anticorpos monoclonais) ou para uso como imunógenos em vacinas. A reprodução da manifestação clínica de uma enfermidade, sob condições experimentais, também requer altos títulos do vírus. Em resumo, a rotina de um laboratório de virologia envolve necessariamente etapas repetidas e contínuas de multiplicação de vírus com finalidades diversas. Como os vírus necessitam células vivas para se multiplicar, sistemas biológicos são utilizados com esse propósito. Três sistemas biológicos têm sido classicamente utilizados para a multiplicação de vírus: animais susceptíveis, ovos embrionados de galinha (OE) e cultivos celulares.

3.1 Inoculação em animais susceptíveis

Durante muitos anos, a reprodução da doença em animais se constituiu na forma mais objetiva de detecção de vírus em material suspeito. A inoculação de animais também serviu para a amplificação do agente para diversos fins, entre eles a produção de vacinas. Os fatores limitantes para esse procedimento incluem o custo elevado de manutenção, a imunidade prévia dos animais ao agente e a baixa reprodutibilidade da enfermidade. Nos últimos anos, questões éticas referentes ao uso experimental de animais somaram-se a essas restrições.

No princípio do século, os bovinos eram inoculados com o vírus da febre aftosa (FMDV) no epitélio lingual. Após o desenvolvimento de vesículas, o fluido era coletado, inativado e utilizado para a produção de vacinas. A utilização de extratos de cérebro de camundongos infectados com o vírus da raiva (RabV), para a produção de vacinas, é outro exemplo da inoculação em animais. Com o desenvolvimento dos cultivos celulares, essa metodologia deixou de ser utilizada. Atualmente, a multiplicação de vírus pela inoculação de animais possui uso muito restrito, dentre os quais se destacam a prova biológica para o diagnóstico da raiva em camundongos lactentes (Capítulo 11). A inoculação de camun-

dongos lactentes é ocasionalmente utilizada para o diagnóstico do FMDV. Para alguns vírus que não replicam eficientemente em cultivo celular, como o vírus da peste suína africana (ASFV), a inoculação de animais, para se obter altos títulos do vírus, é empregada.

3.2 Inoculação em ovos embrionados

Vários vírus de aves e alguns de mamíferos replicam com eficiência em tecidos de embrião de galinha. A habilidade desses vírus em se multiplicar nesse sistema biológico tem sido utilizada para a multiplicação de vírus em laboratório, seja para a detecção de vírus em material clínico, seja para a amplificação de vírus. Essa metodologia teve grande difusão antes do desenvolvimento e estabelecimento dos cultivos celulares, porém, nos dias atuais, está limitada a poucos vírus, principalmente àqueles que não replicam em cultivos.

O material pode ser inoculado por várias vias, dependendo do agente suspeito (Figura 3.11). A presença do agente pode ser evidenciada pelo desenvolvimento de lesões macro e microscópicas características no embrião e/ou nas membranas vitelínicas (Tabela 3.2). Também se pode observar retardo no desenvolvimento e morte do embrião. A presença do agente – e a sua quantificação – também pode ser detectada pela pesquisa da atividade biológica do agente (HA), de antígenos (IFI) ou de ácidos nucleicos virais (hibridização, PCR).

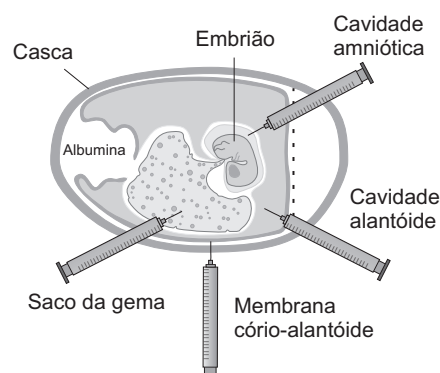


Figura 3.11. Vias de inoculação de vírus em ovos embrionados.

Tabela 3.2. Vírus animais que replicam em embriões de pinto e efeitos da replicação

	Vírus	Idade do embrião	Via de inoculação	Lesão/consequência
BOVINO	Varíola bovina	10-11 dias	Membrana corioalantóide	Focos esbranquiçados (pocks) na membrana, morte do embrião
	Vírus da estomatite vesicular (VSV)	7 dias	Membrana corioalantóide ou cavidade alantóide	Morte do embrião
	Lumpy skin vírus (LSDV)	7 dias	Membrana corioalantóide	Pocks na membrana cório -alantóide.
EQÜINO	Influenza eqüina	10-11 dias	Cavidade alantóide	-
	Encefalomielite eqüina (EEE, WEE e VEE)	10-11 dias	Qualquer via	Morte do embrião
OVINOS	Vírus da língua azul (BTV)	9-11 dias	Intravenosa	Morte do embrião
SUÍNO	Vírus da doença de Aujeszky (PRV)	10 dias	Membrana corioalantóide	Lesões na membrana corioalantóide, invasão do sistema nervoso central, e protusão cerebral do embrião, morte do embrião.
CANINOS e FELINOS	Raiva (RabV)	7 dias	Gema	Retardo do crescimento, distrofia muscular, encefalomalácia
AVES	Newcastle (NDV)	9-11 dias	Membrana corioalantóide ou cavidade alantóide	Morte do embrião
	Influenza aviária (AIV)	9-11 dias	Cavidade alantóide	Morte do embrião

3.3 Inoculação em cultivo celular

A detecção e identificação de vírus em amostras clínicas, após a sua multiplicação em cultivo celular, constituíram-se em uma das primeiras formas de detecção viral. O advento dos antibióticos contribuiu de forma decisiva para o desenvolvimento da Virologia, pois somente a partir daí foi possível estabelecer cultivos celulares em grande escala. A propagação do agente em cultivo celular permite que quantidades mínimas de partículas víricas viáveis sejam detectadas, amplificadas e, posteriormente, caracterizadas. Para os vírus que replicam bem em células de cultivo, esse sistema biológico possui aplicações virtualmente ilimitadas, incluindo: a) isolamento e identificação com fins diagnósticos; b) obtenção de estoques virais para caracterização biológica e molecular; c) uso em testes sorológicos; d) produção de estoques virais para estudos de patogênica; e) produção de antígeno para a imunização de animais (produção de anti-soro ou anticorpos monoclonais); f) produção de vacinas, entre outros.

O isolamento em cultivo celular é considerado a prova ouro (*golden standard*) em diagnóstico virológico, sendo utilizada como padrão de comparação com qualquer outro método. Esse método também é capaz de detectar amostras ocasionais de vírus em material clínico. Vários agentes virais conhecidos resultaram de achados acidentais em cultivo de células, entre estes o circovírus suíno (PCV-1) e o vírus sínio 40 (SV-40). Os cultivos celulares ainda se constituem na forma mais simples e econômica de obtenção de grandes quantidades de vírus viável para a pesquisa e produção de vacinas.

Devido ao fato de nenhuma linhagem celular ser susceptível a todos os vírus, muitos laboratórios mantêm cultivos celulares susceptíveis a diferentes agentes. A escolha de um tipo celular para o isolamento ou multiplicação do vírus está, muitas vezes, associada com a espécie de origem do material e com o histórico clínico da enfermidade. Geralmente, são utilizadas células originárias da espécie animal de origem do vírus. No entanto, isso não é regra, pois existem vários vírus que replicam em células de cultivos de ou-

tras espécies. Por exemplo, o FMDV é cultivado em células de rim de *hamster* (BHK-21); o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) é cultivado em células de rim de macacos (MA-104); e o herpesvírus eqüino (EHV) é cultivado em células de rim de coelhos (RK-13) ou em células de rim de macaco-verde africano (Vero).

Basicamente existem dois tipos principais de cultivos celulares: cultivos primários e as linhagens contínuas. Cada um desses tipos apresenta vantagens e restrições. Os *cultivos primários* originam-se da remoção de um órgão fresco de um embrião ou feto recém-sacrificado. O órgão removido é submetido a um processo mecânico e enzimático para fracionamento do tecido e individualização das células. As células individualizadas são cultivadas em frascos ou garrafas, onde irão aderir e formar uma monocamada. O cultivo é realizado com meio nutritivo e promotores de crescimento, a temperatura de incubação é de 37°C. Nesse processo, a divisão celular é bastante restrita, com uma propagação lenta e limitada, podendo-se dizer que ocorre uma divisão celular a cada 24 horas. Assim, é necessária a realização de subcultivos periódicos, e isso é realizado através da individualização da monocamada pela ação enzimática, ressuspensão e semeadura em novos frascos de cultivo. Nesses novos cultivos, o número celular irá duplicar ou quadruplicar em poucos dias. Após um número variável de subcultivos (10 a 30 passagens, dependendo do tipo celular), as células começam a apresentar taxas reduzidas de multiplicação e, eventualmente, cessam a multiplicação. Os cultivos primários são os preferidos para a realização da multiplicação viral, pois possuem características morfológicas e fisiológicas bastante semelhante às células dos órgãos originais. Sendo assim, possuem uma maior sensibilidade para a infecção viral. A restrição que esse tipo de cultivo apresenta é o número limitado de subcultivos, gerando necessidade de preparação contínua nos laboratórios com alta demanda celular.

As *linhagens celulares* ou *linhagens contínuas* são derivadas de células tumorais ou de tecidos normais que sofreram transformação *in vitro*. Esses tipos de cultivos celulares são cultivados de maneira semelhante aos cultivos primários e pos-

suem capacidade de multiplicação quase indefinida. Por estarem bem adaptadas às condições do cultivo, são de fácil manipulação e propagação. A maioria dos laboratórios dá preferência a esse tipo de cultivo celular devido à sua uniformidade, estabilidade e facilidade de manuseio. Por causa dessa alta taxa de propagação em laboratório, as linhas celulares podem sofrer alterações morfológicas e fisiológicas que alteram a sensibilidade à infecção viral. No entanto, a sensibilidade à infecção com alguns vírus pode ser inferior nas linhagens celulares em comparação com os cultivos primários, mas as vantagens citadas acima compensam este aspecto. Linhagens celulares podem ser obtidas pela transferência entre laboratórios ou pela aquisição junto a bancos depositários.

Diversas linhagens celulares são utilizadas rotineiramente em laboratórios de virologia em atividades de diagnóstico e pesquisa. O nome dessas linhagens geralmente está relacionado com o órgão de origem e freqüentemente contém as letras iniciais do nome do descobridor ou outra característica marcante. Alguns exemplos de linhagens celulares comumente utilizadas em Virologia Veterinária são: MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*), MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), CRFK (*Crandell feline kidney*), CRIB (*cell resistant to infection with bovine viral diarrhea vírus*), RK13 (*rabbit kidney*), PK15 (*porcine kidney 15*), SK6 (*swine kidney*), BHK-21 (*baby hamster kidney clone 21*), IBRS2 (*Instituto Biológico rim de suíno clone 2*), células Vero, entre outras.

Existem ainda cultivos de células que se multiplicam em suspensão, ou seja, não necessitam de uma superfície de contato para adesão e multiplicação. Uma grande vantagem desse tipo de cultivo é a concentração do número de células, reduzindo a relação do número de células, tamanho do frasco e volume de meio utilizado. Essa é uma característica desejável e amplamente utilizada para a produção de vacinas. Células BHK-21 que se multiplicam em suspensão são utilizadas para a multiplicação e produção de estoques do RabV e o FMDV para uso em vacinas.

Alguns vírus não replicam eficientemente em células de cultivo, assim, a sua amplificação requer o uso de outro sistema biológico, como animais susceptíveis (animais de laboratório ou os hospedeiros naturais) ou ovos embrionados.

Outros vírus não replicam em quaisquer dos sistemas biológicos utilizados atualmente, como os papilomavírus, vírus da hepatite C de humanos e os vírus causador da hepatite B (família *Hepadnaviridae*).

O processamento de amostras que potencialmente contenham vírus deve ser realizado rapidamente e seguir algumas regras para aumentar a probabilidade de detecção e multiplicação do agente. Para o diagnóstico, as amostras devem ser inoculadas em cultivos celulares o mais brevemente possível. A inoculação consiste na deposição do material suspeito sobre as monocamadas, seguido de incubação por 1 a 2 horas (período de adsorção). Posteriormente, o inócu-

lo é desprezado, e a monocamada é lavada para remover ou reduzir a presença de substâncias tóxicas e/ou contaminação bacteriana e fúngica. Após, o meio de cultivo é repostado, e as células são incubadas a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂. As monocamadas devem ser observadas diariamente para a presença de alterações morfológicas celulares associadas com a replicação viral (Figura 3.12). Essas alterações, consequências do processo replicativo dos vírus, são denominadas genericamente de efeito citopático (ECP – *cytopathic effect*). Uma grande parcela dos vírus produz alterações morfológicas nos cultivos celulares, que, muitas vezes, são características de um determinado agente ou grupo de vírus. As altera-

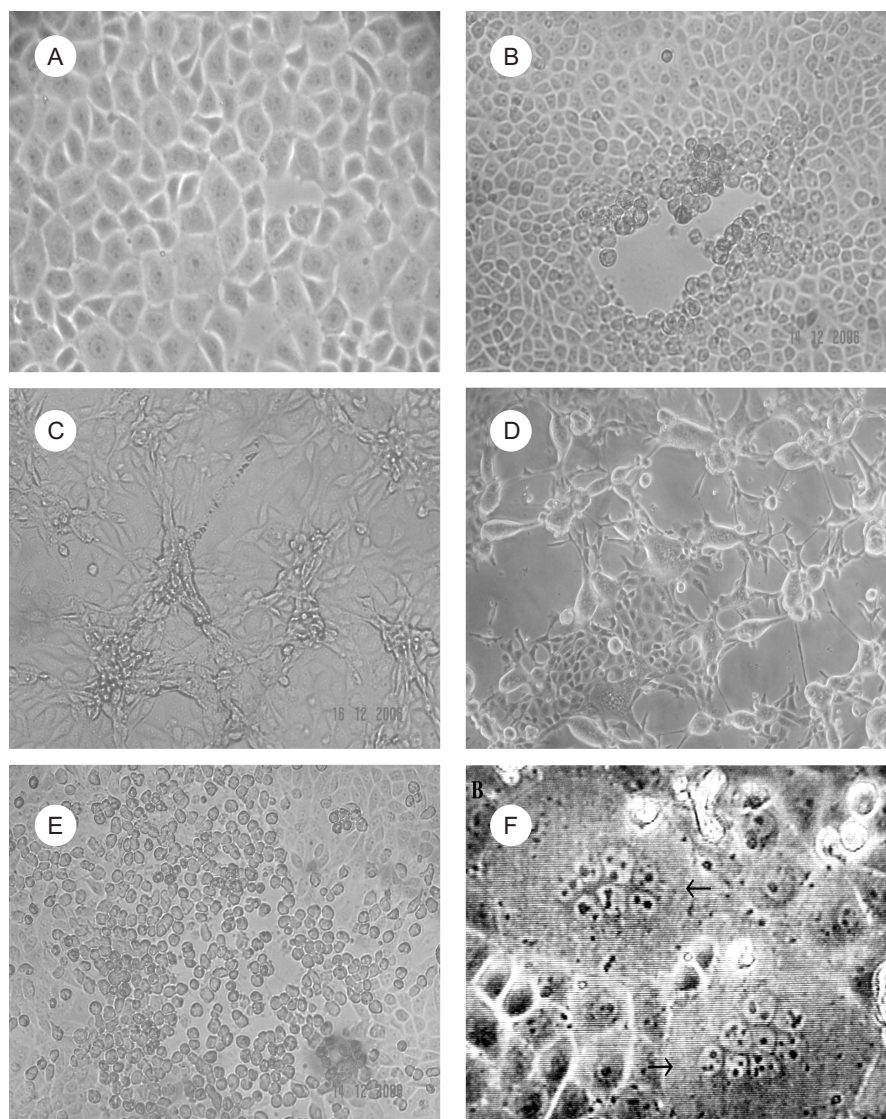


Figura 3.12. Efeito citopático produzido pela replicação viral em células de cultivo. Células de linhagem de rim bovino não-infectadas (A) ou inoculadas com o BoHV-1 (B); BVDV (C); BoHV-2 (D); enterovírus bovino (E); e PI-3v (F). Pode-se observar diferentes tipos de efeito citopático. Para descrição detalhada ver tabela 3.3.

ções frequentemente produzidas pelos vírus são vacuolização citoplasmática, formação de células gigantes multinucleadas (sincícios) e arredondamento celular entre outros. Na Tabela 3.3, estão

descritos os efeitos citopáticos produzidos pelos principais vírus de interesse veterinário.

A visualização dessas alterações ao microscópio óptico é apenas um indicativo da presença

Tabela 3.3. Principais vírus animais, células susceptíveis para replicação in vitro e efeito citopático

Vírus	Tipo celular	Efeito citopático
Bovinos	Adenovírus bovino (BAdV)	Arredondamento e desprendimento celular, formação de focos infecciosos como "cachos de uva". Corpúsculos intranucleares.
	Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)	Vacuolização citoplasmática, degeneração celular, enrugamento do tapete, desprendimento e lise celular (somente as amostras citopatogênicas).
	Herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV 1 e 5)	Desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular; formação de focos infecciosos com o aspecto de "cachos de uva", lise. Corpúsculos intranucleares.
	Parainfluenza bovina tipo 3 (bPI-3)	Arredondamento, citomegalia e refringência celular, formação de grandes sincícios, desprendimento das células. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV)	Arredondamento e refringência celular, formação de pequenos sincícios e desprendimento das células. Corpúsculos acidofílicos intracitoplasmáticos.
	Rotavírus bovino (BRV)	Vacuolização citoplasmática, degeneração e desprendimento celular. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Coronavírus bovino (BCoV)	Formação de sincícios.
	Parvovírus bovino (BPV)	Citomegalia e refringência celular, arredondamento e desprendimento.
	Vírus da mamilitite herpética (BoHV-2)	Arredondamento celular, sincícios multinucleares. Corpúsculos eosinofílicos intranucleares.
	Vírus da leucose bovina (BLV)	Formação de sincícios.
	Vírus da febre aftosa (FMDV)	Condensação nuclear, arredondamento, desprendimento e lise celular.
	Vírus da estomatite vesicular (VSV)	Arredondamento, retração e desprendimento celular, lise.
	Vírus da estomatite papular (BPSV)	Arredondamento, agregação, lise celular. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Vírus da varíola e pseudovaríola bovina	Formação de sincícios. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Rinderpest (RPV)	Arredondamento e refringência celular, seguido de retração com alongamentos citoplasmáticos "pontes" e formação de sincícios. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Vírus da doença Lumpy Skin (LSDV)	Arredondamento e retração da membrana celular e marginalização da cromatina nuclear. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Vírus da febre do vale Rift (RVFV)	Arredondamento e rápida lise celular.
	Vírus da febre catarral maligna (MCFV)	Sincícios grandes, contração, arredondamento e desprendimento celular da monocamada. Corpúsculos intranucleares.

Tabela 3.3. Continuação.

	Vírus	Tipo celular	Efeito citopático
Ovinos e caprinos	Língua azul (BTV)	BHK-21, VERO	Arredondamento celular, fusão.
	Ectima contagioso (ORFV)	HeLa, VERO, cultivos primários de rim e testículo ovino e bovino; fibroblastos de galinhas e patos.	Arredondamento celular, aglomeração e desprendimento celular. Corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos.
	Artrite e encefalite caprina (CAEV)	Células da membrana sinovial de fetos caprinos e cultivos primários de testículos de caprinos.	Formação de sincícios.
	Pneumonia progressiva dos ovinos – Maedi-Visna (OPPV)	Cultivos de pulmão fetal, de células do plexo coróide de ovino ou de leucócitos sanguíneos periféricos.	Formação de sincícios e degeneração celular.
	Poxvírus ovino e caprino	Cultivos primários de testículo de cordeiro.	Vacuolização nuclear. Corpúsculos intracitoplasmáticos eosinofílicos.
Eqüinos	Peste dos pequenos ruminantes (PPRV)	VERO e cultivo primário de rim de cordeiro	Arredondamento, agregação celular e formação de sincício com o núcleo na forma circular. Vacuolização de algumas células. Corpúsculo de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares.
	Herpesvírus eqüino (EHV 1, 2, 3 e 4)	VERO, ED, RK-13, MDBK, BHK-21 e cultivos primários de rim eqüino e fibroblastos da derme eqüina.	Desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular; formação de focos com o aspecto de “cachos de uva”. Corpúsculos intranucleares.
	Anemia infecciosa eqüina (EIAV)	ED, PBMC eqüino, fibroblastos de derme eqüina.	Formação de sincícios somente em leucócitos.
	Encefalomielite eqüina (EEE, WEE e VEE)	VERO, RK-13, BHK-21 e cultivos de fibroblastos de embrião de galinhas e patos.	Lise celular
	Arterite viral eqüina (EAV)	RK-13, VERO, LLC-MK2 e cultivos primários de células de macaco, coelho e eqüino.	Desprendimento celular do tapete, lise
Suínos	Influenza eqüina (EIV)	MDCK	Arredondamento, desprendimento celular
	Doença de Aujeszky (PRV ou SuHV-1)	PK-15, SK6, MDBK, cultivos primários de origem suína.	Desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular e formação de focos com o aspecto de “cachos de uva”. Corpúsculos intranucleares.
	Adenovírus suíno	Cultivos primários de rim suíno, PK-15 e SK6.	Citomegalia e arredondamento celular, desprendimento das células da monocamada. Corpúsculos intranucleares.
	Peste suína clássica (CSFV)	SK6, PK-15.	A maioria dos isolados não causa citopatologia
	Síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV)	MARC-145, MA-104 e células de origem de símios.	Aumento de tamanho, arredondamento e agregação celular, lise.
	Enterovírus suíno (PEV)	PK-15, IB-RS-2, SST e cultivos de células de rim e testículos de suínos.	Lise e desprendimento celular, destruição da monocamada.
	Parvovírus suíno (PPV)	Cultivos primários de rim suíno, ST, PK-15 e SK6.	Arredondamento celular e picnose. Corpúsculos intranucleares.

Tabela 3.3. Continuação.

	Vírus	Tipo celular	Efeito citopático
Caninos e Felinos	Parvovírus canino (CPV)	CRFK, MDCK, A-72 e cultivos primários de células de rim e pulmão de canino e felino.	Aumento do núcleo, enrugamento da membrana celular, arredondamento das células, lise.
	Coronavírus canino (CCoV)	CRFK, A-72 e cultivos de rim, timo e sinóvia de canino.	Formação de sincícios.
	Rotavírus canino	MA-104, A-72, CRFK e cultivos primários de rim de canino.	Vacuolização citoplasmática, degeneração e desprendimento celular. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Herpesvírus canino (CaHV)	MDCK e cultivos primários de rim de canino.	Desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular e formação de focos com o aspecto de "cachos de uva". Corpúsculos intranucleares.
	Vírus da cinomose (CDV)	VERO, MDCK e PBMC de caninos e furão.	Formação de sincícios, desprendimento celular do tapete, inclusões intracitoplasmáticas.
	Adenovírus canino (CAvV)	MDCK, cultivos primários de testículo ou rim de canino e felino.	Arredondamento e desprendimento celular, lise e destruição do tapete. Corpúsculos intranucleares.
	Vírus da raiva (RabV)	CV-1, BHK-21, VERO, HeLa e cultivos de fibroblastos de embrião de galinhas.	Arredondamento e desprendimento celular. Corpúsculos intracitoplasmáticos.
	Calicivírus felino (FCV)	CRFK, FCWF-4, Fe3TG, VERO e fibroblastos felinos.	Arredondamento e desprendimento celular, lise e destruição do tapete.
	Vírus da rinotraqueíte felina (FeHV)	CRFK e cultivos primários de pulmão, rim e testículo de felino.	Desorganização nuclear, arredondamento, desprendimento celular e formação de focos com o aspecto de "cachos de uva". Corpúsculos intranucleares.
	Vírus da peritonite infecciosa felina (FeCoV)	CRFK, A-72, FeWF e cultivos primários de tecidos fetais de felinos.	Arredondamento e desprendimento celular.
	Vírus da panleucopenia felina (FPLV)	CRFK e Fe3TG.	Arredondamento e aumento da refração das células.
	Vírus da imunodeficiência felina (FIV)	PBMC felino.	Formação de sincícios.
Galinhas e Outras Aves	Doença de Newcastle (NDV)	Cultivos primários de rim de embrião de galinhas, cultivos primários de fibroblastos de galinhas e BHK-21.	Formação de sincícios, morte celular.
	Doença de Gumboro (IBDV)	Cultivos primários de células da bursa, rim e fibroblastos de embrião de galinha.	Efeito pouco discernível
	Vírus da laringotraqueíte aviária (ILTAV)	CEK e cultivos de rim, fígado e pulmão de galinhas.	Citomegalia, formação de sincícios.
	Vírus da anemia aviária (CAV)	MDCC-MSB1.	Citomegalia, lise celular.
	Vírus da doença de Marek (MDV)	CK e fibroblastos de embrião de galinhas ou patos.	Desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular. Corpúsculos intranucleares.
	Poxvírus aviário	QT-35, cultivos primários de rim ou derme de embrião de galinha.	Arredondamento, refração celular e desprendimento.

de um agente viral na amostra suspeita. Alguns vírus possuem a capacidade de infectar cultivos celulares de diversas origens, como o vírus da língua azul (BTV), que infecta células de mamíferos e insetos e variações do efeito citopático po-

dem ser observadas. No entanto, a ausência de alterações não indica necessariamente a ausência de vírus. Alguns vírus infectam as células sem causar ECP e são denominados de não-citopáticos, como é o caso do circovírus suíno (PCV-2).

Outro exemplo é o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), que possui amostras citopatogênicas e não-citopatogênicas (Capítulo 22). A confirmação e identificação do agente são, geralmente, realizadas por métodos que detectam alguma atividade biológica (HA ou HAD), antígenos (IFA ou IPX) ou ácidos nucleicos virais (PCR, hibridização). A neutralização com anti-soro específico também pode ser usada para a identificação do agente causador do ECP nos cultivos. Coloração direta, como Giemsa ou hematoxilina e eosina (para corpúsculos de inclusão), também podem ser utilizadas para a confirmação da presença de alguns agentes.

4 Quantificação de vírus

A realização de várias técnicas virológicas requer o conhecimento da quantidade aproximada de partículas víricas presente no material. O procedimento de quantificação é denominado *titulação*, e o valor obtido é dito *título viral*. Existem técnicas diretas e indiretas para a quantificação das partículas víricas. As técnicas diretas baseiam-se na contagem das partículas presentes em uma amostra e observadas ao microscópio eletrônico. Esse método é capaz de informar o número preciso de partículas, porém não diferencia partículas infecciosas de não-infecciosas. Devido a essas particularidades, o método direto de quantificação viral não é utilizado na rotina laboratorial. As técnicas indiretas possuem como base a infectividade do vírus, que é medida por meio de um indicador biológico. A quantificação da infectividade de uma determinada suspensão viral requer necessariamente o uso de sistemas biológicos para a replicação do agente (cultivos celulares, OE ou animais). Como já mencionado, os cultivos celulares são muito utilizados com esse propósito. Para os vírus que não replicam em cultivo, pode-se recorrer aos OE ou animais.

4.1 Diluição limitante

Os testes que utilizam a diluição limitante foram os primeiros desenvolvidos e são muito utilizados pela sua simplicidade. O material é inicialmente submetido à diluição seriada, e cada diluição serve como inóculo para um nú-

mero determinado de cultivos celulares. Quanto maior o número de réplicas, mais preciso será o resultado. Essa técnica geralmente é realizada em placas de microtitulação de 96 cavidades, e cada diluição do material é inoculada em oito réplicas. Após um determinado período de incubação (varia entre 48 h e vários dias, dependendo do vírus), os cultivos são monitorados em relação ao aparecimento do ECP (ou submetidos à IFA ou IPX para detecção de antígenos virais), que são os indicadores da presença de infectividade na respectiva diluição.

O título viral geralmente é expresso como a recíproca da maior diluição capaz de provocar reação específica (ECP ou antígenos virais) em 50% dos cultivos e a unidade será $TCID_{50}$ (*tissue culture infection dose*). Quando a titulação é realizada em animais ou em OE, e o indicador é a morte, a unidade usada é *dose letal 50%* (LD_{50}). Quando o resultado da infectividade é medido de outra forma que não a morte (ex.: paralisia, presença de lesões de pele, prurido), a unidade empregada é *dose infectiva 50%* (ID_{50}). Para os vírus com capacidade hemaglutinante, aplica-se o teste de HA, então a unidade de expressão será unidade hemaglutinante (UH).

Os valores obtidos nos ensaios de titulação são submetidos à análise matemática, que converte os dados de infectividade em valores numéricos com uma acurácia aceitável. Alguns métodos de cálculo são utilizados, no entanto, o método de Reed e Muench é o mais difundido para o cálculo de título viral (Quadro 3.1). Os métodos de Spearman e Kärber; e Seligman e Mickey são menos populares. Esses métodos, apesar de diferirem na metodologia aplicada, baseiam-se na observação da infectividade, portanto, somente consideram as partículas infecciosas.

4.2 Ensaio de placa

Outro método muito utilizado para a quantificação de vírus é o ensaio de placa, descrito inicialmente por Dulbecco, em 1952. Diluições seriadas da suspensão viral são inoculadas em tapetes celulares pré-formados, geralmente em placas poliestireno de seis cavidades. Após a adsorção e a remoção do inóculo, os tapetes são recobertos

Testes de infectividade são rotineiramente utilizados para o cálculo do “título” viral (número de unidades infecciosas por unidade de volume), que é comumente expresso por TCID₅₀/mL ou PFU/mL. Uma unidade infecciosa é definida como a menor quantidade do vírus capaz de produzir um efeito biológico detectável (efeito citopático, ECP) em células de cultivo *in vitro*, ou doença clínica, ou morte em animais. No caso de cultivos celulares, uma unidade infecciosa equivaleria a uma

partícula viral viável capaz de infectar e replicar em uma célula susceptível.
1.TCID₅₀ É definida como a diluição de um determinado vírus necessária para infectar 50% dos cultivos celulares inoculados. Esse tipo de teste consiste na produção e detecção de ECP nas células infectadas. O cálculo da TCID₅₀ em uma suspensão inicial de vírus pode ser feito pelos métodos de Reed & Muench ou Spearman-Kärber.

Diluição	Cultivos celulares		Índices acumulados			Porcentagem (%) = [Infectados/(infectados + não-infectados)] X
	Não-infectados	Infectados	Não-infectados	Infectados	Não-infectados + infectados	
10 ⁻¹	0	8	0	41	41	41/41 =100%
10 ⁻²	0	8	0	33	33	33/33 =100%
10 ⁻³	0	8	0	25	25	25/25 =100%
10 ⁻⁴	0	8	0	17	17	17/17 =100%
10 ⁻⁵	2	6	2	9	11	9/11 =81%
10 ⁻⁶	5	3	7	3	11	3/11 =27%
10 ⁻⁷	8	0	15	0	15	0/15 =0%
10 ⁻⁸	8	0	23	0	23	0/23 =0%

Para o cálculo dos índices acumulados dos cultivos não-infectados (isto é, onde não se observou ECP), soma-se os valores dos cultivos não-infectados, iniciando-se a partir da menor diluição (10⁻⁸). Já o cálculo do índice dos cultivos infectados, é realizado pelo somatório das culturas infectadas (onde o ECP foi visualizado) a partir da maior diluição (10⁻¹). Assim, a diluição apresentada no Quadro 3.1 necessária para a infecção de 50% dos cultivos celulares, obviamente estará entre as diluições 10⁻⁶ (27% infectados) e (10⁻⁵) (81% infectados). A distância proporcional entre essas duas diluições é calculada da seguinte forma:

(% positivo acima de 50%) - 50

----- =

(% positivo acima de 50%) - (% positivo abaixo de 50%)

Assim, tem-se:

81-50

= 0,57

81-27

Este índice ou distância proporcional é utilizado para o cálculo do título viral pelo uso da equação: (fator da diluição onde se observou ECP em mais de 50% das culturas de células) + (índice ou distância proporcional multiplicado pelo logaritmo do fator de diluição). Assim, tem-se (-5) + (0,57 x 1) = -5,57. Desse modo, a diluição limitante da suspensão inicial do vírus capaz de infectar 50% dos cultivos celulares será de 10^{-5,57}. A recíproca deste número será o título viral por unidade de volume empregado para a realização da prova, ou seja, 10^{-5,57} TCID₅₀ em 50µL. Rotineiramente, o título viral é expresso em mililitros (mL). Para isso, basta multiplicar o valor obtido por 20 (1 mL contém 20 vezes o volume de 50µL utilizado para a realização da prova). Finalmente, tem-se 10^{-5,57} que é equivalente a 2 x 10^{-6,57} ou 10^{-6,87} TCID₅₀/mL.

Quadro 3.1. Quantificação de vírus por diluição limitante

com uma camada de meio semi-sólido à base de ágar ou carboximetilcelulose, e incubados por 24 a 72 horas, variando conforme o agente. As partículas virais que penetraram nas células durante a adsorção irão replicar e produzir progênie viral. A cobertura semi-sólida, no entanto, impede que as partículas víricas produzidas se disseminem à

distância. A transmissão do vírus a partir das células inicialmente infectadas ocorre apenas para as células vizinhas, pela transmissão direta entre células. Após alguns dias, são observados focos de destruição celular nos tapetes, denominados *placas*. Cada placa representa um determinado número de células infectadas e destruídas a par-

tir de uma célula originalmente infectada. O número de placas produzidas no tapete, portanto, corresponde ao número aproximado de unidades infecciosas presentes na diluição inoculada. Para uma melhor visualização e contagem das placas, os tapetes são corados com cristal violeta (Figura 3.13).

Nessa técnica, a quantificação é expressa como unidade formadora de placas por mililitro (PFU/mL). Para o cálculo final do título, leva-se em consideração o número de placas produzidas em cada diluição e o volume utilizado para inoculação. Um exemplo de titulação, usando essa técnica, está descrito no Quadro 3.2. Os ensaios em placa são utilizados principalmente para a quantificação de vários vírus citopatogênicos (ou citopáticos), mas podem também ser utilizados para vírus que não induzem citopatologia. Nesses casos, os focos (e não placas) de replicação viral podem ser detectados e contados após a realização da técnica de IPX.

Além de quantificação viral, os ensaios de placa são também utilizados com outras finalidades, incluindo: a) clonagem biológica e purificação de vírus; b) análise de fenótipo de variantes virais; c) ensaios de neutralização viral por anticorpos monoclonais ou policlonais; d) testes de

atividade antiviral de compostos químicos; e) estudos de cinética e replicação viral, entre outras.

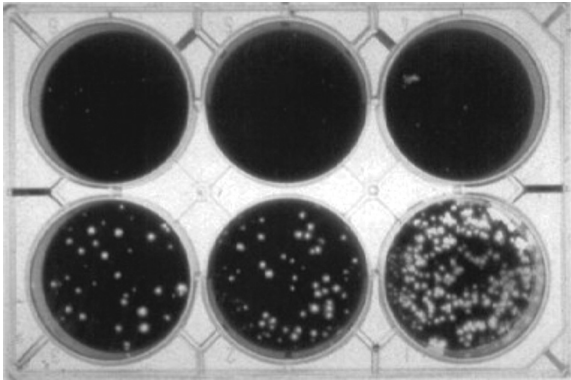


Figura 3.13. Ensaio de placa. Tapetes de células BHK-21 foram infectados com diferentes diluições do vírus da estomatite vesicular (VSV) e, 48 horas após, foram corados com cristal violeta. Linha superior: a ausência de placas é indicativa da ausência de vírus; Linha inferior: observa-se inúmeros focos infecciosos, indicando a replicação viral e lise celular.

4.3 Outros métodos de quantificação

Métodos mais modernos que utilizam a biologia molecular têm sido empregados para a quantificação de vírus, principalmente em medi-

O título de uma suspensão viral do VSV foi calculado pelo método de ensaio de placa. Para isso, três placas de seis cavidades, contendo uma monocamada pré-formada de células BHK-21 foram inoculadas. A partir da suspensão original, realizou-se oito diluições seriadas na base 10, que serviram como inóculo. Cada diluição foi inoculada em duplicada e, para isso, foram

utilizados 200µL/cavidade. Após o período de adsorção, o inóculo foi removido e meio de cultivo contendo carboximetilcelulose foi adicionado. Após 24 horas de incubação, os tapetes celulares foram corados por cristal violeta. Os números da contagem das placas estão apresentados abaixo.

Número de placas									
Diluição	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Controle
Réplicas	incontáveis	incontáveis	168	96	35	0	0	0	0
	incontáveis	incontáveis	150	89	27	0	0	0	0
Média	-	-	159	92,5	31	0	0	0	0

Para a obtenção do título, utiliza-se o número médio de placas presentes na maior diluição em que foi possível observar a replicação do vírus. Dessa maneira, tem-se: 31 x 10⁵ PFU/200µL, que é o equivalente a 3,1x10⁶ PFU/200µL.

Normalmente o título é expresso em mililitro (mL), nesse caso, o volume inoculado foi de 200µL e, para realizar a transformação, deve-se multiplicar por 5. Tem-se, então, 15,5 x 10⁶ PFU/mL ou 1,55 x 10⁷ PFU/ml.

Quadro 3.2. Quantificação de vírus por ensaio de placa

cina humana. Essas técnicas mensuram a carga viral (ou quantidade de vírus) pela análise quantitativa do material genético viral presente em uma amostra clínica. A quantidade de vírus presente nas secreções e excreções de animais infectados com o FMDV pode ser estimada através da técnica de *real time* PCR. Essa mesma metodologia também pode ser aplicada para os vírus da peste suína clássica (CSFV) e AFSV, entre outros. Imunoensaios quantitativos e outros procedimentos imunológicos que fornecem a titulação e que avaliam a presença do vírus em cada diluição são amplamente usados. Esses métodos apresentam a vantagem de permitir realizar diluições, adição de reagentes e leituras colorimétricas automatizadas. Os dados da leitura crua são posteriormente analisados por métodos matemáticos que permitem a identificação correta e precisam das unidades infectantes presentes no material testado. No entanto, esses métodos possuem aplicabilidade restrita em medicina veterinária e dificilmente serão substituídos pelos métodos tradicionais.

5 Identificação e caracterização de um isolado

Os termos *isolado* ou *amostra* de vírus referem-se a um vírus que foi detectado e identificado, mas que ainda não foi completamente caracterizado. O termo *cepa* designa um vírus cujas principais características genotípicas e fenotípicas já foram estudadas e são conhecidas. As cepas são geralmente utilizadas como referência em testes de diagnóstico, em pesquisas e para a produção de reagentes.

A primeira etapa após a detecção de um agente viral a partir de amostras clínicas é a sua identificação. Isso pode ser realizado preliminarmente pelas características do ECP produzido nos cultivos ou pelas alterações produzidas no embrião de galinha. A ME pode ser utilizada para a identificação inicial do agente, de acordo com as suas características morfológico-estruturais. A confirmação da identidade do agente, no entanto, depende do uso de anticorpos específicos (IFA, IPX), de anti-soro específico (SN ou HI) ou de métodos de detecção e identificação de ácidos nucleicos (hibridização, PCR).

A caracterização de uma amostra viral é uma etapa posterior à sua detecção e identificação. Essa etapa geralmente envolve a caracterização antigênica ou sorológica, que pode ser definida como o perfil dos antígenos de um vírus. A obtenção deste perfil é realizada pelo uso de testes que detectam e identificam os determinantes antigênicos presentes nas proteínas virais. Várias técnicas são utilizadas com essa finalidade, incluindo a IFA com anticorpos monoclonais, soroneutralização, fixação do complemento, ELISA, além de outras técnicas sorológicas. A forma de caracterização a ser utilizada depende das particularidades de cada família de vírus e da disponibilidade de técnicas e reagentes do laboratório. A identificação de seqüências específicas pode ser realizada pelo uso de técnicas como o PCR, análise de restrição ou seqüenciamento do genoma viral.

5.1 Sensibilidade a solventes lipídicos

Existe uma correlação entre presença do envelope e susceptibilidade dos vírus aos solventes lipídicos. Durante muito tempo, uma forma de identificação e caracterização da presença de vírus envelopados foi o tratamento com solventes lipídicos previamente à inoculação em cultivo celular ou ovo embrionado. No envelope viral, encontram-se inseridas glicoproteínas, que são responsáveis pelas interações iniciais vírus-célula. A remoção do envelope dos vírus resulta em perda de infectividade e inativação da partícula. A maioria dos vírus envelopados é sensível ao éter e/ou clorofórmio, que são os solventes normalmente utilizados (paramixovírus, herpesvírus, mixovírus entre outros); no entanto, alguns vírus, como os poxvírus, apresentam variações de sensibilidade ao éter.

5.2 Concentração e purificação por ultracentrifugação

Estudos estruturais e ultra-estruturais, produção de antígenos para imunizações ou métodos de detecção, entre outros, requerem soluções contendo altas concentrações de vírus e com elevado grau de pureza. A obtenção de soluções com es-

sas características pode ser feita de várias maneiras, das quais se destacam a ultracentrifugação. A ultracentrifugação é um método relativamente fácil, rápido e prático, em que o material de alta qualidade é obtido. Seu princípio baseia-se na taxa de sedimentação do vírus, que, por sua vez, é dependente do tamanho, densidade, morfologia da partícula, bem como da natureza do meio e da força de centrifugação. A maior restrição é o custo do equipamento, que difere das centrífugas por atingir velocidades que variam entre 20.000 e 100.000 rotações por minuto (RPM).

6 Biossegurança laboratorial

A manipulação em laboratórios de agentes infecciosos, como os vírus, pode representar risco

de infecções inadvertidas ou disseminação de enfermidades entre humanos e animais. Isso pode ser observado em várias descrições do passado. O FMDV, devido a sua alta infecciosidade, talvez tenha produzido os exemplos mais conhecidos. A infecção de pesquisadores pelo vírus Marburg, em um laboratório da Alemanha na década de 1970, é outro exemplo. No princípio, uma alternativa para evitar acidentes, como a disseminação do vírus febre aftosa ou introdução de agentes exóticos no rebanho de um país, foi a construção de laboratórios em ilhas, o caso mais conhecido é de *Plum Island Animal Disease Center*, nos Estados Unidos. Posteriormente outros laboratórios de segurança elevada e acesso restrito, para manipulação de agentes virais e animais infectados, foram estabelecidos, tais como: o *Australian Ani-*

Tabela 3.4. Níveis de biossegurança para manipulação de agentes virais

Nível				
BSL-1				
BSL-2				
BSL-3				
BSL-4				
Vírus	Vírus não-zoonóticos.	Associados com infecções em humanos, risco de auto-inoculação, ingestão ou exposição da pele e mucosas.	Agentes exóticos ou selvagens, com potencial de transmissão por aerossol e de produzir doença severa ou letal.	Agentes altamente perigosos ou exóticos, com risco de vida para humanos, transmitidos por aerossóis, ou agentes de periculosidade desconhecida.
	Normas básicas de prática laboratorial.	BSL-1, com acesso limitado, identificação das áreas de manipulação, primeiros socorros e descontaminação do lixo e resíduos.	Normas do BSL-2, com acesso restrito e controlado, coleta de soro do trabalhadores, descontaminação de todo o lixo e resíduos e esterilização das roupas antes da lavagem.	Normas do BSL-3, com mudanças de roupas ao ingressar na área contaminada. Requerimento de banho para saída, descontaminação de todo o material antes da remoção do laboratório.
	Nenhum requerido.	Aventais, luvas, óculos, conforme a necessidade. Manipulação de material que produz aerossol em cabine de fluxo laminar do tipo I ou II.	Requerimentos do BSL-1 e toda manipulação em cabine de fluxo laminar do tipo I ou II. Uso de luvas, aventais, respiradores, conforme a necessidade.	BSL-3, utilização de cabine de fluxo laminar tipo III ou cabines tipo I e II em ambiente com pressão positiva, macacões de corpos inteiro com respiradores para todos os procedimentos.
	Bancada laboratorial.	BSL-1 com autoclave.	BSL-2 acrescido de separação física para corredores e áreas de circulação, porta duplas, pressão negativa nos laboratórios, sistema de filtração do ar.	BSL-3, área ou prédio isolado com suprimento de ar e exaustão, vácuo e sistema de descontaminação.
	BoHV, BVDV, BLV, BTV, PRV, CDV, outros.	Adenovírus humano, citomegalovírus, influenza A, B e C, rubéola, poliovírus, parainfluenza, vírus da raiva.	Herpesvírus dos símios (vírus B), vírus da encefalite japonesa, hantavírus, febre amarela, encefalite eqüina venezuelana, vírus do Nilo Ocidental.	Vírus Ebola, Marburg, sabiá, febre do vale Rift, entre outros.

Adaptada de Murphy et al., 1999.

mal Health Laboratory na Austrália, o *Onderstepoort Veterinary Institute* na África do Sul, o *Institute for Animal Health* na Inglaterra, o *Center for Disease Control (CDC)* em Atlanta e, mais recentemente, o *Canadian Science Center for Human and Animal Health*, em Winnipeg, no Canadá.

A manipulação de amostras infectadas para pesquisa ou diagnóstico deve seguir as normas da boa prática laboratorial. Dessa maneira, contaminações inadvertidas de amostras ou disseminações da infecção entre humanos ou animais são evitadas. Conforme a infra-estrutura do laboratório e o risco dos agentes manipulados, os laboratórios de virologia são classificados em Níveis de Segurança (BSL) 1, 2, 3 ou 4 (Tabela 3.4). O uso de técnicas assépticas, roupas adequadas (avental, máscaras, luvas e óculos) e desinfetantes apropriados são cuidados básicos e necessários em todo trabalho laboratorial, independente do nível de segurança. O uso de equipamentos, tais como: cabines de fluxo laminar, sistema de filtração do ar, tratamento e esterilização de dejetos, descarte e incineração dos dejetos são requisitos necessários para laboratórios que manipulem agentes com risco médio a elevado, conforme o caso.

7 Bibliografia consultada

BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. **Methods in Molecular Biology: PCR protocols**. 2.ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. 545p.

CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic virology: a practitioner's guide**. St. Louis, MO: Mosby, 1992. 285p.

FRESHNEY, R.J. **Culture of animal cells**. 2.ed. New York, NY: Wiley-Liss, 1987. 397p.

HIRSCH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology**. Malden, MA: Blackwell Science, 1999. 480p.

KAHRS, R.F. **Viral diseases of cattle**. 2.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2001. 324p.

MAHY, B.W.J.; KANGRO, H.O. **Virology methods manual**. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 374p.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.

OIE. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. 3.ed. Paris, France: OIE, 1997. 723p.

RICHMOND, J.Y.; MCKINNEY, R.W. (Eds). **Biosafety in microbiological and biomedical laboratory**. 4.ed. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1999. 265p.

ROVOZZO, G.C.; BURKE, C.N. **A manual of basic virological techniques**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1973. 287p.

STORCH, G.A. Diagnostic Virology. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.18, p.493-531.

STRAW, B.E. et al. (eds). **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2002. 1209p.

SWAYNE, D.E. et al. **A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4.ed. Tallahassee, FL: Rose Printing, 1998. 311p.

TIMONEY, J.F. et al. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8.ed. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates, 1988. 951p.

VERSTEEG, J. **A colour atlas of virology**. Weert, Netherlands: Wolfe Medical Publications, 1985. 240p.

GENÉTICA E EVOLUÇÃO VIRAL

Mauro Pires Moraes & Hernando Duque Jaramillo¹

4

1 Genética viral	89
1.1 Conceitos e definições	90
1.2 Mutação	92
1.3 Classificação genotípica	93
1.4 Classificação fenotípica	93
1.5 Taxa de mutação	94
1.6 Interações genéticas entre vírus	95
1.6.1 Recombinação	95
1.6.2 Ressortimento	97
1.7 Outras interações virais	97
1.7.1 Complementação	97
1.7.2 Mistura fenotípica	98
1.7.3 Poliploidia	98
2 Evolução viral	99
2.1 Origem dos vírus	99
2.2 Quando se originaram os vírus	100
2.3 Como os vírus ampliaram o seu repertório protéico	100
2.4 Capacidade de mutação viral	100
2.5 Estudos laboratoriais de evolução	102
2.6 Exemplos de evolução viral	102
2.6.1 Vírus da estomatite vesicular: tempo <i>versus</i> fatores ambientais	102
2.6.2 Mixomatose na Austrália	103
2.6.3 Vírus da influenza	104
2.6.4 Parvovírus canino	105
2.7 Conclusões	105
3 Bibliografia consultada	106

¹ Responsável pela seção de Evolução Viral.

1 Genética viral

As populações virais, principalmente aquelas de vírus RNA, são excelentes modelos para estudos de evolução genética. Devido ao ciclo replicativo dos vírus ser extremamente rápido, tanto em infecções naturais como em cultivo celular, os processos de seleção e evolução podem ser observados em um curto espaço de tempo. Assim, a genética de populações virais pode ser considerada uma visão minimalista e simplista da evolução das espécies.

Ao longo de sua história natural – que pode remeter há milhões de anos – os vírus vêm realizando um número incontável de ciclos replicativos em seus hospedeiros, sendo constantemente transmitidos entre hospedeiros. Alguns necessitam utilizar diferentes espécies de hospedeiros – mesmo invertebrados – para assegurar a sua manutenção na natureza. As infecções naturais resultam em pressão de seleção constante, que acaba moldando o perfil genético e fenotípico dos vírus, pois favorece e permite a sobrevivência das variantes que melhor se adaptam ao hospedeiro e que são mais eficientemente transmitidas. Dentre as propriedades que favorecem a sobrevivência e evolução dos vírus destacam-se: a) capacidade de replicar e ser excretado em altos títulos; b) capacidade de se adaptar a novos tecidos, órgãos e/ou hospedeiros; c) capacidade de ser excretado por longo tempo; d) capacidade de se reproduzir e ser excretado sem produzir doença severa na maioria de seus hospedeiros; e) capacidade de escapar dos mecanismos imunológicos do hospedeiro; f) capacidade de resistir no meio ambiente, tanto fora de células vivas como em animais vertebrados ou invertebrados, assegurando a sua sobrevivência até alcançar um novo hospedeiro; g) habilidade de ser transmitido verticalmente entre hospedeiros.

Dentre as características que apresentam relevância na genética das populações virais e facilitam a compreensão da sua evolução, destacam-se a grande quantidade de progênie viral produzida a partir da infecção de uma única célula e o curto período de tempo de geração. Para se ter uma idéia desta dinâmica, a infecção de uma célula, com uma única partícula infecciosa,

pode produzir uma progênie de mais de 100.000 novos vírions em pouco mais de 10 horas. Isso corresponde a uma cópia do genoma produzida a cada meio segundo. Considerando-se infecções de hospedeiros multicelulares – ou mesmo cultivos celulares – as gerações se sucedem em magnitude (número de indivíduos produzidos) e velocidade inimagináveis. Um ingrediente adicional nesta complexidade é a potencial variação genética da progênie. Nos vírus RNA, geralmente ocorre uma mutação para cada 10.000 nucleotídeos incorporados aos novos genomas, ou seja, cada novo genoma potencialmente contém, pelo menos, uma mutação e, em alguns casos, a grande maioria da progênie pode ser distinta do vírus parental. Esses eventos, em conjunto, proporcionam uma grande capacidade de adaptação dessas populações, resultando em novas gerações de vírus com propriedades distintas das parentais, de acordo com o ambiente em que replicam.

A genética dos vírus possui implicações em todos os aspectos de sua biologia, incluindo a evolução e seleção de variantes adaptados ao meio, distribuição espacial e temporal, espectro de hospedeiros, patogenicidade e virulência, interações com o sistema imunológico do hospedeiro, entre outros. O estudo da genética viral tem como objetivos conhecer a composição genética do genoma e como as informações genéticas nele contidas se refletem no fenótipo do vírus. Assim, o conhecimento da genética viral pode ter um amplo espectro de aplicações, que vão desde a sua utilização para otimizar o manejo sanitário de um rebanho até a produção de recombinantes atenuados para uso em vacinas.

A genética viral clássica era baseada no isolamento e análise fenotípica de um grande número de mutantes naturais, estudos de complementação, recombinação natural, determinação da ordem e posição dos genes no genoma e, finalmente, na análise fenotípica dos mutantes para determinar a função dos genes. Notáveis avanços foram obtidos com o desenvolvimento dos cultivos celulares na década de 1950 e com o advento das técnicas moleculares a partir do final dos anos 1970. Essas técnicas permitiram a análise detalhada da sequência, estrutura e função de ácidos e proteínas virais e inauguraram uma nova etapa

no estudo da genética dos seres vivos. Embora alguns procedimentos genéticos clássicos continuem em uso, grande parte foi substituída por métodos modernos que permitem uma análise mais detalhada e aproximada das relações entre genótipo e fenótipo.

A seqüência completa do genoma de virtualmente todos os vírus de interesse humano e animal já foi determinada e, atualmente, encontra-se disponível em bancos de dados de acesso público. As funções de grande parte das proteínas virais também já foram estabelecidas, tanto por métodos diretos como por inferência a partir de seqüências de aminoácidos e estrutura de outras proteínas semelhantes. De especial relevância para a Virologia é o conjunto de procedimentos denominados genericamente de “genética reversa”, que realizam a análise fenotípica a partir da composição genética, ao contrário da genética clássica. Assim, o conhecimento da genética e a disponibilidade das técnicas moleculares têm permitido a manipulação do genoma dos vírus, a produção de recombinantes com mutações em genes específicos e o estudo do impacto dessas mutações no fenótipo viral. Essas técnicas e conhecimentos adquiridos têm proporcionado um progresso notável na Virologia, permitindo a identificação e manipulação de genes envolvidos em virulência e nas interações com o sistema imune, como, por exemplo, para a produção de vacinas mais eficientes e seguras.

A seqüência completa de nucleotídeos do genoma dos vírus pode ser determinada por técnicas de *seqüenciamento de DNA*. Em se tratando de vírus RNA, a análise e manipulação dos genomas são facilitadas pela sua conversão em moléculas de DNA complementar (cDNA) por meio de *transcrição reversa*. Genomas recombinantes, contendo deleções de genes, inserções de genes heterólogos ou mutações pontuais em nucleotídeos ou seqüências específicas podem ser obtidos pelo uso de técnicas moleculares de manipulação enzimática e clonagem de DNA. Vírus contendo genes de outros vírus de interesse podem ser produzidos *in vitro* para estudos de patogenia, usos em terapia genética e em vacinas. Proteínas virais, para uso terapêutico ou vacinal, podem ser expressas em sistemas heterólogos. Essas são

apenas algumas aplicações da tecnologia de DNA recombinante e técnicas moleculares em geral no estudo da genética e biologia dos vírus. Considera-se que os limites da manipulação genética dos vírus serão impostos apenas pelas restrições biológicas, ou seja, será possível modificar tudo e apenas o que a biologia permitir.

Este capítulo abordará os principais mecanismos genéticos e de evolução das populações virais. Dentre esses, serão discutidos os mecanismos relacionados diretamente com as características de replicação do genoma, como as mutações; aqueles resultantes de interações entre diferentes vírus, como a recombinação, rearranjo, complementação; algumas interações entre vírus e hospedeiros, como a integração; e as interações não-genéticas entre vírus. A seção de evolução abordará alguns aspectos e hipóteses sobre a origem e evolução dos vírus, e de como esses micro-organismos conseguem se perpetuar e evoluir, apesar das constantes restrições impostas pelo meio e pelas defesas dos hospedeiros. Ao final, serão apresentados alguns exemplos de evolução de vírus humanos e animais e as conseqüências biológicas nas interações desses agentes com os seus hospedeiros.

1.1 Conceitos e definições

Os princípios básicos, conceitos e terminologia utilizados em genética de vírus são basicamente os mesmos empregados no estudo da genética de outros organismos. Assim, eventos como mutação, recombinação e seleção possuem significado semelhante quando aplicados aos vírus. A genética viral, no entanto, possui algumas particularidades que são derivadas das peculiaridades da biologia desses agentes. A replicação e a conseqüente expansão viral, por exemplo, é um processo muito mais rápido do que em outros organismos uni- ou multicelulares. Para se ter uma idéia dessa dinâmica, a infecção de uma célula por uma única partícula vírica pode resultar na produção de uma progênie de mais de 100.000 vírions em poucas horas. Considerando-se as infecções naturais em hospedeiros multicelulares – vertebrados, por exemplo – ou mesmo em cultivos celulares, a população derivada de um

único progenitor se expande exponencialmente em uma velocidade impressionante. Como resultado, as gerações de vírus se sucedem a uma velocidade incomparável com aquela observada em organismos multicelulares. Essa característica faz com que os vírus sejam muito utilizados como modelo para estudos genéticos e evolutivos.

Assim, quando se estuda os diversos aspectos da biologia e genética dos vírus, na verdade está se estudando uma população numerosa de indivíduos (vírions), e não um indivíduo isolado ou um grupo pequeno (como em estudos genéticos em bovinos, por exemplo). Então, quando se refere a uma cepa ou um mutante viral, a referência é feita ao conjunto de unidades víricas que compõe aquela população de vírus.

Quando se refere a um determinado vírus – vírus da cinomose (CDV), por exemplo – está se referindo a uma espécie viral. Uma espécie viral é definida como uma população de vírus genética e biologicamente muito semelhantes entre si, derivada de ancestrais comuns. Assim como os demais organismos uni- ou multicelulares, as diferentes espécies virais – ou os diferentes vírus – são compostos por inumeráveis indivíduos, que podem ser mais ou menos semelhantes entre si. Ou seja, a similaridade genética e fenotípica entre os vírus que compõem uma espécie variam entre as espécies. Os componentes de uma população de vírus RNA (vírus da influenza, por exemplo) são mais variáveis entre si do que os vírus DNA. Em outras palavras, as populações de vírus variam em sua homogeneidade/heterogeneidade, sendo que os vírus RNA são mais variáveis. Cabe recordar que uma célula infectada com um único vírion pode produzir centenas de milhares de novas partículas, não necessariamente idênticas em suas seqüências de nucleotídeos. Assim, uma amostra do vírus da diarreia viral bovina (BVDV), isolada no Brasil, é provavelmente diferente genética e antigenicamente de amostras isoladas em outras partes do mundo. Por outro lado, os vírus DNA tendem a ser mais estáveis geneticamente e pouca variação é encontrada entre os vírus de uma mesma espécie. As diferenças nos níveis de homogeneidade/heterogeneidade entre os vírus DNA e RNA devem-se principalmente às propriedades das enzimas replicativas

desses vírus, que apresentam diferentes taxas de erro ao replicarem os genomas.

Em razão da heterogeneidade genética e fenotípica que pode existir em uma população de vírus de uma mesma espécie – sobretudo em vírus RNA – os estudos genéticos geralmente são realizados com vírus purificados. Através de clonagem biológica e posterior expansão dos clones obtidos, é possível se obter populações homogêneas de vírus derivados de um único ancestral. Os vírus purificados (ou clonados) a partir de populações mistas são geralmente aqueles mais abundantes e predominantes na população, sendo, por isso, os seus verdadeiros representantes. À medida que esses clones são expandidos, no entanto, a tendência é que a progênie viral se torne gradualmente divergente geneticamente devido à geração contínua de indivíduos com mutações. Por isso, quando se deseja trabalhar continuamente com populações homogêneas de vírus, essas populações devem ser periodicamente clonadas.

Além dos conceitos acima, algumas definições são também necessárias para o entendimento dos princípios de genética viral, embora a sua aceitação e terminologia nem sempre sejam universais. Cabe ressaltar que as definições a seguir – como já definido –, referem-se aos vírus como populações, colhidas diretamente dos hospedeiros ou de cultivos celulares onde são multiplicados:

– *Vírus de campo (wild-type)*: é o vírus original ou parental, a partir do qual se realiza estudos biológicos, genéticos ou moleculares. Esta população de vírus serve de base para as comparações genotípicas e fenotípicas feitas com populações derivadas dela ou com outras populações da mesma espécie viral, porém de outra origem. Embora a denominação remeta ao vírus original que foi obtido de animais infectados, os *vírus de campo*, utilizados em estudos biológicos e genéticos, nem sempre são exatamente iguais àqueles originalmente isolados. Isto porque a obtenção de títulos virais compatíveis com vários estudos requer a sua multiplicação, às vezes, por passagens sucessivas em cultivos celulares ou em ovos embrionados. Esses ciclos sucessivos de replicação podem resultar em alterações genéticas e fenotí-

picas no vírus. De forma ideal, os vírus de campo utilizados em quaisquer experimentos devem ter sido cultivados o menor número de vezes possível. O termo *selvagem* também tem sido utilizado para designar os vírus de campo;

– *Mutante*: é o vírus que difere do vírus parental na sequência de nucleotídeos de seu genoma, ou seja, apresenta alterações de bases e/ou de segmentos genômicos em comparação com o vírus de campo. Algumas mutações não se refletem em alterações fenotípicas e, por isso, são chamadas de mutações silenciosas (*silent mutations*). Nesses casos, o fenótipo do vírus mutante é indistinguível do parental e a sua identificação depende de análise da sequência do genoma. Por outro lado, as mutações que resultam em alterações fenotípicas podem ser detectadas pela observação e análise das características fenotípicas alteradas. Vírus temperatura-sensíveis (TS), por exemplo, são mutantes que não replicam bem à temperatura corporal (37-38°C), ao contrário do vírus parental. Os vírus TS geralmente necessitam uma temperatura mais baixa (30-34°C) para replicarem com eficiência. Mutantes de placa pequena (*small plaque mutants*) são vírus que se disseminam deficientemente em cultivo celular, produzindo focos menores de destruição celular do que os produzidos pelo vírus parental. Esse fenótipo está geralmente associado com uma capacidade reduzida de transmissão direta entre células. Mutantes de gama de hospedeiros (*host range mutants*) são vírus que diferem dos vírus parentais em relação ao espectro de hospedeiros que infectam *in vivo*, ou em relação aos tipos celulares que podem infectar *in vitro*. O termo *variante* é usado para designar um determinado vírus (uma população de vírus) que apresenta alguma diferença fenotípica em relação ao vírus de campo, ou seja, é uma definição essencialmente fenotípica. As diferenças fenotípicas entre os vírus parentais e os seus variantes certamente são reflexos de mutações no genoma;

– *Cepa* (ou estirpe): é um vírus cujas características biológicas e/ou moleculares são razoavelmente conhecidas. Em contraste, uma amostra (ou isolado) é um vírus isolado de animais sobre o qual não se tem um maior conhecimento. Amostras (ou isolados) podem se tornar cepas

a partir da sua caracterização laboratorial. Em outras palavras, as cepas são alguns isolados ou amostras de um determinado vírus que sofreram caracterização após o seu isolamento. No entanto, essas definições não possuem utilização universal, e o termo *cepa* é, muitas vezes, utilizado para designar isolados não-caracterizados e vírus de campo.

O termo *cepa de referência* é utilizado para designar cepas virais conhecidas que são utilizadas por diferentes laboratórios com fins diagnósticos e/ou produção de reagentes, vacinas e mesmo para estudos de patogenicidade.

1.2 Mutação

O termo mutação é utilizado para designar alterações na sequência de nucleotídeos no ácido nucléico genômico de um determinado organismo comparando-o com o seu parental. As mutações surgem naturalmente como resultado da infidelidade das polimerases – principalmente as polimerases de RNA – que incorporam nucleotídeos incorretos durante a replicação do genoma. Mutações também podem ser induzidas por métodos químicos (hipoxantina, bromodeoxiuridina) ou físicos (raios X, ultravioleta e gama). Acredita-se que muitas mutações que ocorrem naturalmente resultam na produção de vírus inviáveis, ou seja, constituem-se em mutações letais. Esses tipos de mutações não são percebidas e não possuem impacto na adaptação e evolução viral, pois os genomas mutantes são incapazes de replicar. Logo, quando se faz referência a mutantes, cepas, tipos ou variantes virais, sempre são consideradas as mutações não-letais, que permitem diferenciar o indivíduo e a sua progênie do vírus parental.

Como foi mencionado, as mutações podem ser espontâneas (resultados de erros durante a replicação) ou induzidas (resultados de danos ao ácido nucléico por agentes químicos ou físicos). As mutações naturais são mais frequentes nos vírus RNA (um nucleotídeo incorreto entre 10^3 a 10^4 nucleotídeos inseridos) do que nos vírus DNA (um erro a cada 10^8 a 10^{11} nucleotídeos incorporados). A maior taxa de mutação observada nos vírus RNA deve-se à menor fidelidade da

polimerase de RNA, que incorpora nucleotídeos incorretos com maior frequência, além da incapacidade de corrigir os erros cometidos. As polimerases de DNA, por sua vez, cometem menos erros e, ainda assim, são capazes de corrigi-los, substituindo os nucleotídeos incorretos incorporados às cadeias nascentes.

Os mutantes gerados durante a replicação viral, quando apresentam uma vantagem seletiva em comparação com os parentais, serão amplificados com maior eficiência e rapidamente tornam-se predominantes na população viral. Por outro lado, mutantes que não apresentam vantagem seletiva tendem a permanecer em proporção pequena e ocasionalmente desaparecem da população, caso repliquem com menor eficiência do que os demais indivíduos. Ou seja, a evolução de uma determinada população viral depende da taxa de mutação e da seleção a qual os vírus gerados são submetidos.

1.3 Classificação genotípica

Um dos critérios usados para a classificação de mutantes baseia-se nas características genotípicas da mutação. Mutações causadas por simples substituições de nucleotídeos são chamadas de *mutações pontuais*. As mutações pontuais podem ser do tipo *transição*, quando há substituição de uma purina por outra purina (A ou G) ou pirimidina por outra pirimidina (C ou T); ou *transversão*, quando ocorre a substituição de uma pirimidina por uma purina ou vice-versa. Outras mutações envolvem *deleções* ou *inserções* de segmentos de tamanhos variáveis de ácido nucléico.

Outra forma de classificação das mutações pontuais considera as suas consequências na codificação de aminoácidos, quando a mutação ocorre em seqüências codificantes do genoma. Assim, as mutações podem ser silenciosas (*silent mutations*) quando a troca do nucleotídeo não resulta na codificação de outro aminoácido. A proteína sintetizada permanece a mesma e não ocorre mudança no fenótipo do vírus. Mutações de sentido trocado (*missense*) são aquelas em que a troca de nucleotídeos resulta na codificação de outro aminoácido. As consequências dessas mutações são variáveis, dependendo do novo

aminoácido incorporado à proteína e da possível alteração da conformação e/ou função proteica. Mutações *missense* podem ser absolutamente inócuas (se o aminoácido incorporado não alterar a função da proteína) ou mesmo letais (se o novo aminoácido alterar drasticamente a função da proteína codificada). Mutações sem sentido (*nonsense*) resultam na produção de um códon de terminação da tradução (*stop codon*) em uma seqüência aberta de leitura (ORF). Com isso, ocorre a produção de uma proteína truncada, cuja funcionalidade pode variar amplamente, dependendo do local onde a mutação é introduzida. Essas mutações são classificadas como âmbar (*amber* = UAG), ocre (*ochre* = UAA) ou opala (*opal* = UGA). As consequências de mutações *nonsense* também variam amplamente, e muitas delas são provavelmente letais ou, pelo menos, deletérias para a viabilidade do vírus.

Embora as mutações e suas consequências sejam mais estudadas em seqüências codificantes de proteínas, certamente também são importantes em regiões regulatórias de transcrição e replicação (promotores, *enhancers*, origens de replicação etc.), e em seqüências nucleotídicas envolvidas na encapsidação dos genomas recém-formados.

1.4 Classificação fenotípica

Os mutantes virais também podem ser classificados quanto às consequências fenotípicas de suas mutações. Várias características fenotípicas podem ser consideradas nesta classificação, e os mutantes podem ser selecionados pela sua habilidade em produzir placas de lise celular; por exemplo. Alguns mutantes de adenovírus podem egressar precocemente da célula infectada, em comparação com os seus parentais, e, conseqüentemente, produzem maiores placas de destruição celular *in vitro*. Essa característica pode estar relacionada com alterações da virulência do vírus, ou seja, mutantes virais que produzem placas maiores *in vitro* podem possuir maior virulência em hospedeiros susceptíveis *in vivo*. Este fenômeno já foi observado em diversos vírus, incluindo o vírus da peste suína clássica (CSFV). Em outros casos, pode não existir uma correlação entre tamanho de placa *in vitro* e virulência *in vivo*. Nes-

ses casos, o fenótipo serve apenas como um parâmetro para a seleção de mutantes com diferentes habilidades replicativas *in vitro*.

Outro fenótipo observado para a seleção de mutantes é a capacidade de replicação a diferentes temperaturas. Como já mencionado, os mutantes TS replicam bem a temperaturas de 30-34°C (denominada temperatura permissiva) e não replicam com eficiência a 37°C (temperatura não-permissiva). Mutantes adaptados ao frio (*cold adapted*) replicam melhor sob temperaturas baixas, mas retêm alguma capacidade de replicar a 37°C. Frequentemente, essa característica é atribuída a alterações conformacionais de determinadas proteínas, especialmente as polimerases virais, dependendo da temperatura. Ou seja, pela mudança na sua sequência de aminoácidos em determinada temperatura, essa proteína não manteria sua conformação secundária ou terciária e perderia a sua função. Esses mutantes podem ser utilizados em vacinas atenuadas, pois replicam apenas em áreas superficiais do corpo, sem se disseminar sistemicamente no organismo.

A alteração da gama de hospedeiros é outra característica fenotípica utilizada na classificação de mutantes. Alguns mutantes podem não replicar com a mesma eficiência nos mesmos hospedeiros que os vírus de campo, reduzindo, assim, a sua abrangência. Um exemplo típico é um mutante do vírus da febre aftosa (FMDV) que surgiu, em 1997, na Tailândia. Esse mutante natural não possuía a habilidade de infectar bovinos – principal espécie hospedeira do vírus – infectando apenas suínos.

Uma forma importante de seleção de mutantes é a resistência a determinadas drogas. A pressão de seleção exercida pelas drogas antivirais permite o seu uso para a seleção e pesquisa desses mutantes. Anticorpos neutralizantes também podem ser utilizados para a seleção de vírus resistentes à neutralização. Para isso, os vírus são cultivados *in vitro* na presença de anticorpos neutralizantes. Os mutantes originados que eventualmente não forem reconhecidos pelos anticorpos – por alterações nas proteínas de superfície – são rapidamente amplificados e se

tornam predominantes na população. Esses vírus são chamados de *mutantes de escape* antigênico. A geração natural de mutantes de escape é uma estratégia utilizada por vírus que produzem infecções persistentes, sobretudo os retrovírus, pois podem seguir replicando no hospedeiro mesmo na presença de anticorpos.

Mutantes deficientes em atividade enzimática são aqueles que apresentam mutações nos genes que codificam determinadas enzimas, como a timidina quinase dos herpesvírus. Esses mutantes apresentam capacidade de replicação semelhante a dos vírus parentais *in vitro*, mas a sua virulência é atenuada quando são inoculados em animais susceptíveis. A exemplo dos mutantes TS, esses vírus também podem ser utilizados para a produção de vacinas. Os mutantes que apresentam atenuação da virulência, sem que necessariamente se conheça a causa, são conhecidos como *mutantes atenuados*.

1.5 Taxa de mutação

As taxas de mutação natural dependem basicamente da 'fidelidade' da enzima polimerase e da sua capacidade de corrigir eventuais erros cometidos durante a polimerização das novas cadeias de ácido nucléico. As polimerases de DNA, que utilizam moléculas de DNA como molde para a síntese de novas moléculas, geralmente apresentam um sistema de correção (*proofreading*) para aqueles nucleotídeos incorporados erroneamente. Esse processo envolve sequências funcionais específicas (motivos) com atividade exonuclease, que são capazes de remover os nucleotídeos incorretos e substituí-los pelos corretos. Em contraste, as enzimas que polimerizam RNA a partir de RNA não possuem a capacidade de *proofreading*. Como consequência, as polimerases de DNA apresentam uma taxa de um erro para cada 10^{10} a 10^{11} nucleotídeos incorporados, enquanto as polimerases de RNA apresentam um erro a cada 10^3 a 10^4 nucleotídeos. Isso significa que a taxa de erros cometida durante a replicação dos vírus RNA pode ser até um milhão de vezes maior do que aquela resultante da replicação dos vírus DNA. A diferença nas taxas de mutação se constitui na principal causa da grande variabi-

lidade genética e antigênica dos vírus RNA em comparação com os vírus DNA.

Os erros de incorporação são essencialmente randômicos, mas a sua detecção em mutantes naturais indica que podem existir regiões onde há uma maior concentração de erros, conhecidos como pontos quentes (*hot spots*). Essas diferenças estão relacionadas com a habilidade dos mutantes sobreviverem com essas mudanças. Regiões mais conservadas são aquelas em que as mutações eventualmente introduzidas não se perpetuam na população por provocarem efeitos deletérios aos novos genótipos.

1.6 Interações genéticas entre vírus

1.6.1 Recombinação

Classicamente, o termo recombinação é utilizado para designar um intercâmbio de seqüências genéticas entre dois genomas. Esse processo é muito estudado em moléculas de DNA e ocorre, com grande freqüência, na maioria das células eucariotas e procariotas. Alguns mecanismos de reparo do DNA, por exemplo, baseiam-se em eventos de recombinação genética entre os cromossomos homólogos. Mecanismos semelhantes são observados em vírus DNA e parecem fazer parte do seu processo evolutivo. Esse processo envolve o alinhamento de duas moléculas com seqüências semelhantes, a clivagem da cadeia contínua do DNA, o intercâmbio de uma região do genoma e a religação da cadeia de DNA, originando moléculas híbridas ou recombinantes (Figura 4.1). Por causa da necessidade do alinhamento de seqüências entre moléculas semelhantes, este processo é denominado *recombinação homóloga*. Na biologia dos vírus, recombinações podem ocorrer entre dois vírus de uma mesma espécie viral ou, ocasionalmente, entre o genoma viral e o DNA da célula hospedeira.

A recombinação homóloga parece ser comum entre os vírus DNA e aqueles que apresentam moléculas de DNA intermediárias de sua replicação, como os retrovírus. Em células infectadas, esse processo é realizado com o auxílio de

enzimas e fatores auxiliares do hospedeiro. Em tese, a recombinação homóloga pode ocorrer entre o genoma do vírus e da célula e entre dois genomas virais. As conseqüências da recombinação entre dois genomas virais variam de acordo com a similaridade das seqüências recombinadas e com o seu impacto no fenótipo viral. Cabe ressaltar que a recombinação entre dois vírus geralmente ocorre entre vírus da mesma espécie e depende de uma infecção concomitante por esses vírus.

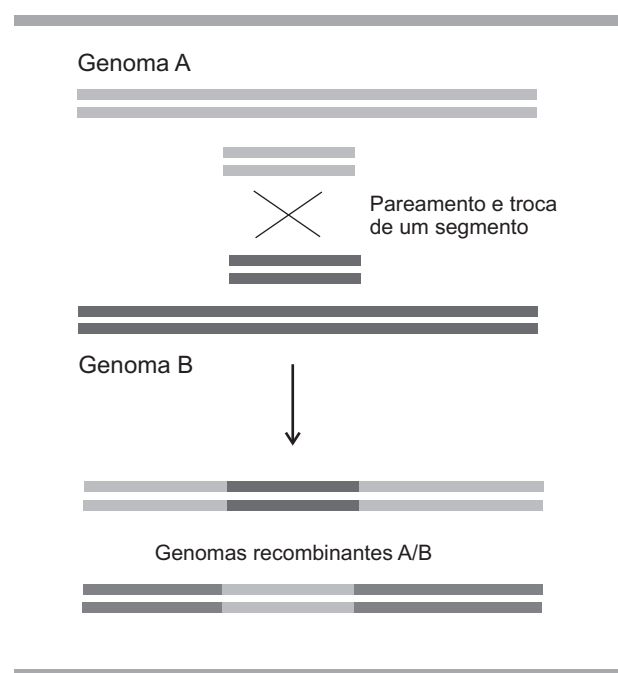


Figura 4.1. Ilustração simplificada da recombinação homóloga entre duas moléculas de DNA.

Nos vírus RNA clássicos, esse evento é mais raro e, provavelmente, não utiliza enzimas celulares. Os picornavírus – e provavelmente outros vírus RNA de genoma não-segmentado – apresentam uma forma de recombinação pouco eficiente e diferente da recombinação homóloga. A recombinação genômica desses vírus envolve o mecanismo de *escolha do molde* (*copy-choice*). Nesses casos, a polimerase de RNA inicia a síntese da cadeia filha utilizando uma molécula de RNA como molde, mas troca de molde durante a polimerização, resultando em moléculas híbridas de RNA, com seqüências mistas derivadas de mais de uma molécula molde (Figura 4.2).

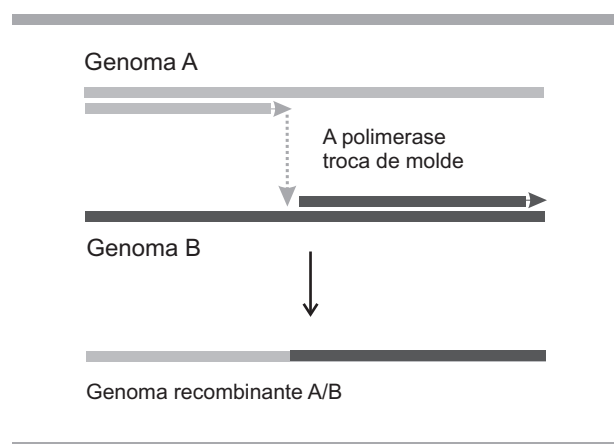


Figura 4.2. Ilustração simplificada do modelo de recombinação de RNA pelo mecanismo de *copy choice*.

Alguns exemplos de recombinação de vírus RNA na natureza servem para ilustrar as suas possíveis consequências. Um exemplo clássico

é a recombinação entre RNA viral e seqüências celulares (provavelmente de RNAs mensageiros), além de recombinações intramoleculares, que ocorrem durante infecções persistentes com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Nesses casos, o vírus que produz a infecção persistente é não-citopático e replica continuamente no animal, muitas vezes sem consequências clínico-patológicas. No entanto, eventos de recombinação e/ou rearranjos genômicos, envolvendo o genoma viral e seqüências celulares, ocasionalmente resultam na geração de mutantes citopáticos. A geração desses mutantes no animal persistentemente infectado é seguida do desenvolvimento de doença fatal, denominada doença das mucosas. Os mutantes citopáticos podem conter uma variedade de mutações, inserções e rearranjos genômicos (Figura 4.3.). Casos de recombinação

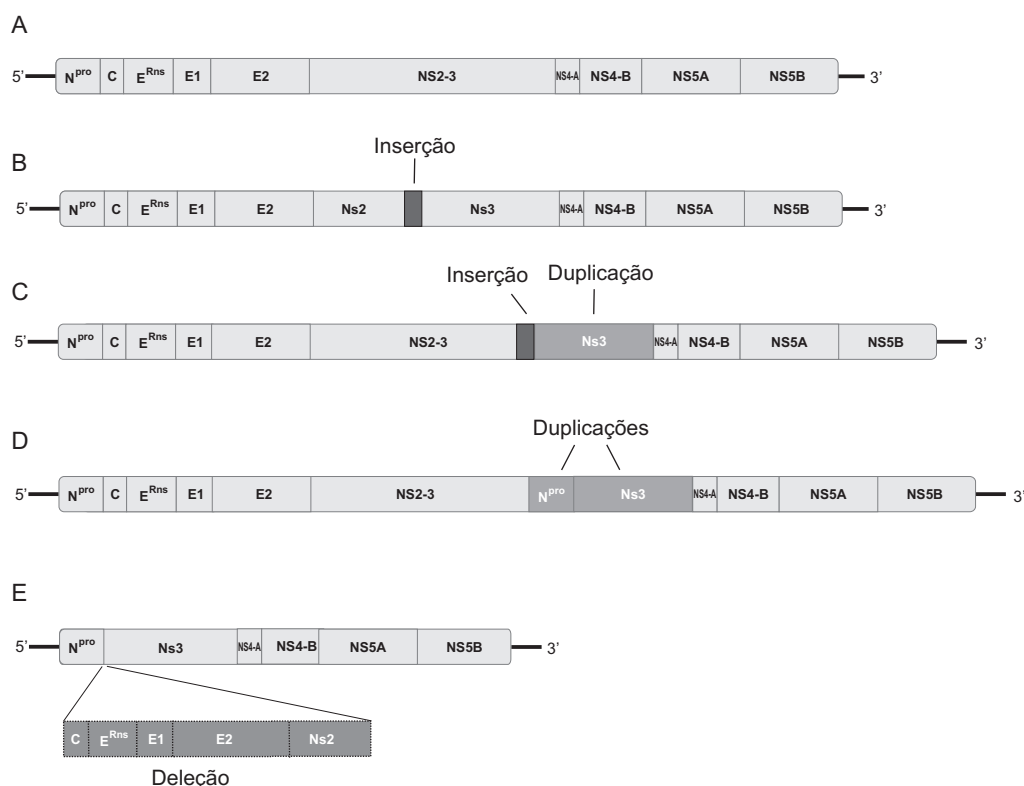


Figura 4.3. Ilustração de genomas do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) contendo alterações genéticas. A) Genoma do vírus de campo não-citopático; B-E) Genomas de mutantes citopáticos gerados por recombinação genética; B) Genoma contendo uma inserção de seqüência celular; C) Genoma contendo uma inserção de gene celular e duplicação do gene na proteína NS3; D) Genoma contendo duplicações dos genes N^{pro} e NS3; E) Genoma defeitivo contendo uma deleção que abrange os genes das proteínas estruturais e a NS2.

de amostras de campo e cepas vacinais do BVDV, com consequências diversas, também já foram relatadas.

Eventos de recombinação também têm sido descritos nos togavírus e coronavírus, com consequências que incluem o surgimento de novos vírus, apresentando espectro de hospedeiros e virulência alterados. No entanto, esses processos ainda não estão totalmente elucidados. Provavelmente, há uma correlação direta com a estratégia de replicação utilizada por esses vírus. Até o momento, não há evidência desse tipo de recombinação em vírus com genoma RNA de sentido negativo.

O mecanismo natural de recombinação tem sido explorado em laboratório, para a produção de vírus recombinantes, com características determinadas para usos diversos, incluindo estudos genéticos de virulência e produção de vacinas.

1.6.2 Ressortimento

Esse mecanismo é exclusivo dos vírus que possuem o genoma RNA segmentado (ortomixovírus, bunivírus, arenavírus, reovírus e birnavírus) e pode ocorrer quando há uma infecção concomitante por duas cepas do mesmo vírus. Nesses casos, os segmentos genômicos recém-replicados são redistribuídos de maneira irregular na progênie viral, resultando em vírions que contêm uma mistura de segmentos dos dois vírus parentais. Esse mecanismo tem sido bem documentado nos vírus da influenza e tem sido responsabilizado pelo surgimento de cepas altamente patogênicas resultantes do reassortimento entre vírus aviários e de mamíferos (Figura 4.4). Esses eventos ocorrem com maior frequência em suínos, que podem ser infectados tanto por vírus aviários como por vírus de mamíferos. De fato, várias cepas do vírus da influenza que causaram surtos em humanos e suínos podem ter resultado de reassortimento entre vírus previamente existentes. Do ponto de vista evolutivo, o reassortimento representa um importante evento para o vírus, pois resulta em uma alteração genética e fenotípica muito rápida.

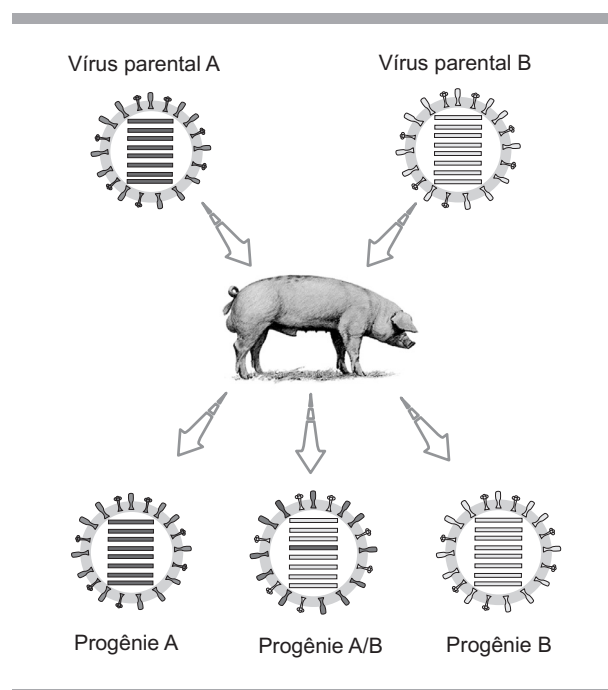


Figura 4.4. Ilustração do mecanismo de reassortimento entre dois vírus da influenza resultante de uma co-infecção em suínos.

1.7 Outras interações virais

1.7.1 Complementação

Esta interação é puramente fenotípica e não resulta de modificação do genoma viral. Por exemplo, se dois mutantes TS, determinados por mutações em genes distintos, infectarem concomitantemente uma célula, a característica fenotípica pode ser revertida e ambos os vírus podem replicar a 37°C, porém as características genotípicas permanecem as mesmas. Esse tipo de complementação é do tipo *intergênica* ou não-alélica (*nonallelic*). Quando as mutações determinantes dos TS ocorrem no mesmo gene, mesmo que com modificações diferentes, é pouco provável que ocorra complementação.

Com menor frequência, a complementação pode ser *intragênica* ou alélica (*allelic*). Essa complementação pode ocorrer quando o produto do gene mutante origina uma proteína com múltiplas subunidades, e as subunidades que são funcionais podem complementar a deficiência do complexo final.

O processo de complementação também ocorre em determinadas populações de vírus que são submetidas a várias passagens *in vitro*. Durante esse processo, são gerados genomas defeituosos contendo deleções em um ou mais genes. Esses genomas defeituosos não são capazes de replicar autonomamente, pois não contêm genes que codificam proteínas essenciais para a replicação. A presença concomitante de um genoma íntegro nas células infectadas, no entanto, permite a complementação das funções ausentes nos genomas defeituosos e, assim, esses genomas são continuamente replicados. Embora esse evento seja bem caracterizado na biologia de vários vírus *in vitro*, a sua ocorrência e significado biológico *in vivo* permanecem incertos.

1.7.2 Mistura fenotípica

Essa alteração é caracterizada pela interação entre dois vírus com a produção de progênie distinta dos vírus parentais. Os vírus resultantes são caracterizados pela presença de diferentes determinantes antigênicos e as partículas virais possuem componentes de ambos os vírus parentais (Figura 4.5). Como a complementação, a mistura fenotípica não envolve mudanças genéticas na progênie. Ou seja, os vírions resultantes possuem componentes estruturais oriundos dos dois vírus parentais, porém os seus genomas são idênticos aos dos vírus parentais. A mistura fenotípica pode ocorrer entre vírus da mesma família ou de famílias diferentes.

Um exemplo de mistura fenotípica entre famílias distintas ocorre entre membros da *Rhabdoviridae* e *Paramyxoviridae*. Os vírus dessas duas famílias possuem proteínas distintas no envelope, porém com funções semelhantes e, quando co-infectam uma determinada célula, podem realizar a mistura fenotípica. Há também a possibilidade de produção de pseudovírions, quando o nucleocapsídeo pertence a um vírus e o envelope a outro (exemplo: nucleocapsídeo de retrovírus e envelope de um rbdovírus). Nesse caso, o tropismo dos vírus resultantes será o mesmo dos rbdovírus, enquanto a progênie formada será de retrovírus.

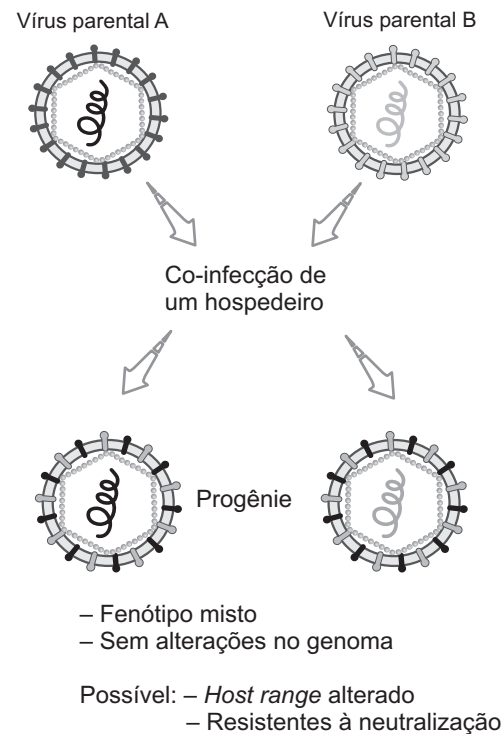


Figura 4.5. Ilustração da mistura fenotípica resultante da co-infecção de uma célula por dois vírus diferentes. A progênie viral pode conter vírus com fenótipos mistos, porém com o genoma de um dos dois vírus parentais.

1.7.3 Poliploidia

A grande maioria dos vírus animais é haplóide, ou seja, possui apenas uma cópia do genoma nos vírions. Os retrovírus se constituem em exceções, pois os vírions contêm duas cópias idênticas do genoma (são diplóides). Porém, os paramixovírus podem, ocasionalmente, apresentar múltiplas cópias de seu genoma – encapsulados em múltiplos nucleocapsídeos – em uma única partícula vírica, fenômeno denominado poliploidia.

Existem descrições de isolados do vírus do sarampo que, eficientemente, produzem vírions com, pelo menos, duas cópias do genoma. Essas duas moléculas de RNA são complementares e possuem mutações diferentes, existindo a necessidade da presença das duas fitas para ocorrer a replicação.

2 Evolução viral

Quando se fala em evolução, geralmente se relaciona esse termo com um processo longo, que ocorre durante milhões de anos. No entanto, mesmo para os vírus muito antigos (alguns com indícios de existência por mais de 220 milhões de anos), o processo de evolução ocorre rapidamente e é permanente, em razão do grande número de gerações produzidas em um curto espaço de tempo. As mudanças evolutivas dos vírus se produzem em questões de dias, e é possível avaliar as suas consequências no fenótipo viral em nível laboratorial. Essa capacidade de mudança possui implicações importantes na emergência de novos patógenos, como tem sido testemunhado durante as últimas décadas, com a emergência de vírus como o da imunodeficiência humana (HIV), o parvovírus canino (CPV) e as mudanças periódicas que capacitam os vírus da influenza a iniciar novas pandemias.

A evolução viral tem sido tema de estudos intensos nos últimos anos e, conseqüentemente, tem permitido a compreensão dos seus mecanismos e efeitos. Esta seção não pretende ser um tratado exaustivo de um tema tão complexo, apenas se trata de um resumo geral, que inclui algumas das teorias recentes sobre a origem dos vírus, sua rápida capacidade de mudança, a maneira como se estuda a evolução em laboratório e no campo, as implicações da evolução viral na patogênese e aparecimento ou emergência de novas enfermidades. O conhecimento acerca dos mecanismos utilizados pelos vírus para alterar as suas propriedades genéticas e fenotípicas pode permitir a utilização de manejos mais adequados dos surtos e o planejamento mais efetivo de programas sanitários para o controle de infecções virais.

Todos os seres vivos evoluem com o decorrer do tempo, mas a rapidez de evolução dos vírus RNA situa-se várias ordens de magnitude acima da velocidade de evolução dos organismos cujo genoma é formado por DNA. Essa característica pode ser explicada pela infidelidade e incapacidade de correção das polimerases de RNA, o que resulta em um número maior de erros durante a replicação do genoma.

2.1 Origem dos vírus

O estudo da origem e evolução dos vírus é realizado principalmente por alinhamento e comparação de seqüências de ácidos nucleicos e proteínas, análises filogenéticas e por estudos das estruturas tridimensionais das enzimas e proteínas estruturais. Ainda que não exista uma evidência inequívoca que permita determinar quando se originaram e com que rapidez evoluíram, pode-se afirmar que os diferentes vírus não possuem uma origem comum e que vários grupos deles surgiram independentemente. Através dos anos, têm-se proposto várias teorias sobre a origem desses agentes. A *teoria regressiva* propõe que os vírus evoluíram por simplificação ou regressão de parasitos intracelulares que perderam os genes requeridos para a replicação independente. A *teoria de origem celular* defende que os vírus surgiram de componentes celulares que adquiriram a habilidade de replicar de forma autônoma dentro da célula hospedeira. A *teoria da co-evolução* com as células – muito favorecida na atualidade, mas de difícil comprovação – propõe que tanto os vírus RNA como os vírus DNA se originaram de plasmídeos (cromossomos acessórios que replicam independentemente do DNA celular). Estes plasmídeos poderiam ter adquirido, provavelmente por recombinação com o genoma das células hospedeiras, genes que permitiam a sua transformação em elementos genéticos com as três características básicas dos vírus. Essas características são: a) codificar mecanismos que permitam a replicação intracelular; b) capacidade de empacotar o ácido nucleico em partículas víricas, que são biologicamente inativas e relativamente resistentes no meio extracelular; e c) capacidade de ser transmitido entre células. Pode-se deduzir, portanto, que antes de se converter em vírus, esses plasmídeos já continham as funções necessárias para a sua replicação independente e que alguns deles começaram a desenvolver parte da maquinaria protéica (polimerases) que permite a replicação do seu material genético. Posteriormente, teriam adquirido os genes que codificam as proteínas necessárias para empacotar o seu genoma e transportá-lo entre células. Teriam ad-

quirido também um variado repertório de proteínas, para uma melhor manipulação das funções celulares, do sistema imunológico do hospedeiro e para a produção de uma progênie mais abundante.

2.2 Quando se originaram os vírus

A dependência de uma célula hospedeira para a ocorrência da replicação poderia implicar que os vírus se originaram depois das células eucariotas. No entanto, alguns elementos que compõem os vírus podem ter se originado antes da evolução celular. O genoma dos vírus RNA, por exemplo, pode ter surgido nos primórdios da vida, em um mundo constituído por RNA e que consistiria de moléculas de RNA catalíticas e auto-replicativas.

Aparentemente, todos os vírus RNA se originaram de um único ancestral ou desenvolveram soluções comuns para problemas similares. A análise comparativa das seqüências de aminoácidos das polimerases dos vírus RNA (enzimas que sintetizam cópias do genoma RNA) favorece a hipótese de que o seu gene seja codificado por vírus de procariotas e de eucariotas. Essa observação indica que a molécula ancestral das polimerases de RNA provavelmente se originou antes da divergência evolutiva em procariotas e eucariotas. Outras superfamílias de enzimas comuns a todos os vírus RNA e que, como as polimerases, apresentam um alto grau de similaridade, também reforçam a hipótese de uma origem muito antiga e monofilogenética dos vírus RNA. Essas superfamílias são as helicases e algumas proteases semelhantes a quimiotripsinas.

2.3 Como os vírus ampliaram o seu repertório protéico

Após a aquisição dos genes básicos que permitiam a replicação e construção do capsídeo viral contendo o genoma, os vírus continuaram evoluindo e ampliando o número de genes do seu genoma, para codificar novas proteínas, e, conseqüentemente, adquirir novas funções e propriedades evolutivas.

Um dos mecanismos utilizados para a aquisição de novas seqüências é a recombinação do

genoma viral com o ácido nucléico de outros vírus ou das células hospedeiras. A recombinação do genoma pode ocorrer entre vírus diferentes, inclusive entre vírus que pertençam a famílias distintas. Os vírus são muito ativos na obtenção de seqüências genômicas por recombinação com outros vírus durante a sua evolução, e essa característica tem dificultado a construção de árvores filogenéticas únicas, que facilitem uma classificação lógica e única. Como resultado dessas recombinações, vírus de grupos muito distintos podem possuir genes relacionados e seqüências homólogas.

A recombinação pode ocorrer entre regiões do próprio genoma viral (recombinação intramolecular), resultando em duplicação de genes, deleções e inserções, com a transformação em novos genes. Assim, uma determinada seqüência de nucleotídeos pode duplicar-se várias vezes e, dessa maneira, originar famílias de genes, como ocorre nos poxvírus e no vírus da peste suína africana (ASFV).

Os vírus também podem obter novos genes mediante a síntese de uma nova seqüência de nucleotídeos ou pelo uso de seqüências abertas de leitura (ORFs; *open reading frame*) alternativas. Combinações desses mecanismos já foram descritas, como a duplicação de um gene acompanhada de mudança de ORF.

Esses processos de recombinação seguem ocorrendo e podem ter conseqüências diversas na biologia dos vírus, incluindo alterações na especificidade de hospedeiro, tropismo tecidual, patogenicidade e virulência, como também podem resultar na emergência de novos vírus.

2.4 Capacidade de mutação viral

O estudo das enzimas que catalisam a replicação dos ácidos nucléicos – as polimerases – tem demonstrado que as polimerases de DNA celulares possuem uma alta fidelidade. Isto se deve, em parte, à capacidade dessas enzimas de remover nucleotídeos inseridos equivocadamente. A taxa de erro dessas polimerases tem sido calculada em 10^{-8} a 10^{-11} nucleotídeos por replicação. Isso significa que, em uma molécula de DNA de um bilhão de nucleotídeos polimerizados, apenas um nucleotídeo errado será incorporado. A taxa de

erro das polimerases virais de DNA é 20 a 100 vezes maior.

Em contraste, as polimerases dependentes de RNA não possuem mecanismos de correção, e, por isso, a sua taxa de erro é muito alta: entre 10^{-3} a 10^{-4} nucleotídeos/replacação. Portanto, cada novo genoma RNA viral com 10.000 nt contém uma média de três mutações pontuais (três nucleotídeos diferentes do genoma parental). Algumas dessas mutações podem ser prejudiciais aos vírus, enquanto outras são neutras e não possuem nenhum efeito. É provável também que algumas mutações introduzidas durante a replicação resultem em benefícios para a replicação viral, conferindo vantagens evolutivas aos vírus mutantes. Uma mesma mutação pode ter efeitos diferentes para um vírus, dependendo do meio em que se encontre. Por exemplo, uma determinada mutação pode conferir vantagens para a replicação do vírus em suínos, porém pode ser adversa para a sua replicação em bovinos. Essas mutações, que ocorrem ao acaso, são mantidas ou descartadas por meio dos processos de seleção natural por conferir maior aptidão biológica. O conhecimento das consequências dessas mutações pode ser útil para a manipulação viral, pois possibilita o desenvolvimento de vacinas baseadas em variantes virais atenuadas ou adaptadas a outras espécies.

Como cada novo genoma de RNA viral sintetizado possui pelo menos três mutações, as seqüências genômicas e os vírus individuais produzidos continuamente são diferentes entre si. Essa distribuição de indivíduos não idênticos, porém muito semelhantes, foi denominada por Manfred Eigen como *quasispecies*. Portanto, os indivíduos que compõem uma *quasispecie* apresentam pequenas variações nas seqüências genômicas, porém aqueles indivíduos que apresentam uma maior aptidão biológica e eficiência de replicação tornam-se predominantes sobre os demais e são produzidos em maior abundância. Apesar do polimorfismo existir em virtualmente todos os seres vivos, o termo *quasispecie* viral é utilizado para enfatizar a grande variação que os vírus componentes de uma mesma população exibem. Esse termo é utilizado para os vírus RNA pela sua grande variabilidade genética. Assim mesmo, os diferentes vírus RNA apresentam níveis variáveis de variabilidade genética.

A característica das polimerases de introduzir mutações é muito favorável para os vírus, permitindo a produção de mutantes que, eventualmente, possam se adaptar ao hospedeiro ou a diferentes condições do meio. Em alguns casos específicos, os vírus que possuem polimerases com maior fidelidade apresentam deficiências em sua aptidão biológica. Isso sugere que a evolução tende a conservar esta capacidade de erro das polimerases, mas mantendo-as abaixo de um limite denominado nível de erro limite (*threshold error*). Acima desse nível não seria possível a sobrevivência dos vírus como espécie.

Os vírus constituem a combinação da grande diversidade de indivíduos, com seqüências diferentes e que possuem a propriedade de produzir progênie abundante. Como exemplo, o vírus da poliomielite (um picornavírus) produz uma descendência de 10.000 indivíduos em uma única célula infectada. A população viral sofrerá, então, um processo de seleção natural cada vez que as condições do meio se alterem. Assim, os indivíduos com maior aptidão para sobreviver a essas novas condições se tornarão também os mais abundantes.

A alta taxa de alterações produzidas no genoma dos vírus RNA é o motor que permite a exploração rápida de novos espaços evolutivos. Em outras palavras, as mutações no genoma podem refletir em mudanças de aminoácidos e essas novas combinações de aminoácidos podem gerar novas estruturas protéicas com propriedades e funções inéditas. Essas propriedades e funções podem ser importantes para a adaptação do vírus a novos hospedeiros ou para escapar da vigilância do sistema imune, por exemplo.

É importante também observar que a seleção natural faz parte do processo evolutivo. O processo de seleção faz com que os indivíduos que contenham mutações que favoreçam a sua replicação em determinado meio produzam maior descendência e predominem na população. Por exemplo, uma mutação nas proteínas do capsídeo pode fazer com que um vírus escape da neutralização por anticorpos. Esses vírus que escapam da neutralização sofrem um processo de seleção quando infectam animais vacinados e, com o tempo, passam a predominar e substituir a população viral original.

2.5 Estudos laboratoriais de evolução

O estudo da dinâmica de evolução dos vírus RNA *in vitro* tem sido realizado principalmente em bacteriófagos e no vírus da estomatite vesicular (VSV). A frequência de recombinação do VSV é muito baixa e não é detectável. Esse fenômeno permite que se utilizem duas populações virais competindo em células, sem que haja intercâmbio genético entre elas. Caso se consiga uma característica ou marcador que identifique e diferencie essas populações, é possível saber as proporções de cada população ao longo de passagens seriadas em cultivos de células e avaliar a *aptidão biológica relativa* de cada população. Uma característica fenotípica utilizada nesses estudos é a resistência (ou escape) à neutralização por anticorpos, presente em uma das populações, devido a mutações introduzidas pela polimerase. Dessa maneira, foram isolados mutantes cujas sequências consenso diferiam da sequência da cepa progenitora somente em um aminoácido, sendo resistentes à neutralização por um anticorpo monoclonal específico. Quando a cepa progenitora e a cepa resistente à neutralização são misturadas, é possível determinar a proporção de placas produzidas por cada uma das cepas cultivadas na presença ou ausência do anticorpo monoclonal. No cultivo com a presença do anticorpo, somente são amplificados os vírus da cepa resistente à neutralização, enquanto no cultivo sem anticorpos são produzidas placas produzidas por vírus das duas cepas. Dessa forma, é possível quantificar a proporção de placas formadas por componentes de cada cepa e determinar qual cepa apresentou maior aptidão biológica.

Esses experimentos podem ser relacionados com muitas observações epidemiológicas realizadas em populações animais. As altas densidades animais nas criações intensivas requerem programas sanitários especiais, pois, após a introdução de um patógeno, a aglomeração de animais favorece os ciclos de infecção iniciados com grandes populações de vírus, e a evolução viral contribuiria para uma maior aptidão biológica. Em contraposição, as baixas densidades de animais na população produzem indiretamente um “gargalo genético” e, como consequência, os vírus são

mais benignos, alguns animais não adoecem e podem desenvolver imunidade natural por contato com o vírus de baixa aptidão biológica.

2.6 Exemplos de evolução viral

Mesmo que a capacidade teórica de mutação e exploração do espaço evolutivo por parte dos vírus pareça ilimitada, a estrutura e funções das diferentes proteínas e ácidos nucleicos desses agentes, assim como as interações com os hospedeiros, já sofreram um processo intenso e prolongado de otimização da aptidão biológica. Portanto, provavelmente há restrições que limitem a capacidade real de mudança. Por essa razão, é possível que vírus isolados de uma mesma região com um grande intervalo de tempo sejam virtualmente idênticos. Ou seja, já teriam atingido um genótipo/fenótipo equilibrado e suficientemente evoluído ou, por outro lado, já teriam esgotado a sua capacidade de evolução.

Quando se analisa a evolução viral, pode-se observar como os diferentes vírus utilizam distintas estratégias evolutivas. Em seguida, são apresentados alguns exemplos que ilustram essas mudanças evolutivas que conduzem à aquisição de uma maior aptidão biológica, isto é, à produção de progênie viral mais bem adaptada e mais numerosa.

Existem vírus cujas mutações facilitam a sua adaptação ao meio e outros cujas alterações genéticas alteram a sua virulência. Existem também aqueles que alteram as suas propriedades antigênicas para garantir seus ciclos contínuos de transmissão e alguns que usam estratégias que ampliam seu tropismo para outras espécies e/ou tecidos. Todas essas alterações ocorrem com o objetivo único de garantir a sobrevivência e manutenção desses agentes na natureza.

2.6.1 Vírus da estomatite vesicular: tempo versus fatores ambientais

O vírus da estomatite vesicular (VSV) é um vesiculovírus pertencente à família *Rhabdoviridae*. O VSV infecta uma grande variedade de ruminantes e suídeos domésticos e silvestres, causando uma doença clinicamente semelhante à febre

aftosa, caracterizada por febre e lesões vesiculares na boca, focinho, patas e em regiões do corpo com abrasões ou lesões mecânicas.

As análises filogenéticas de isolados do VSV de várias regiões da América Central e do Norte têm demonstrado que as seqüências de cepas de uma mesma região geográfica apresentam um alto grau de conservação, mesmo quando isoladas a grandes intervalos de tempo (até 30 anos). Essa característica não é observada para os vírus isolados na mesma época em diferentes regiões. A distribuição filogenética mostra um melhor agrupamento dos vírus por regiões geográficas. A evolução desse vírus depende de pressões de seleção relacionadas com fatores ecológicos, como os vetores que transmitem o vírus e os animais reservatórios que o mantêm. Para esse vírus, não foi detectada a evolução por pressão imunológica seletiva, que é muito evidente para o vírus da influenza, por exemplo.

2.6.2 Mixomatose na Austrália

Muitos estudos clássicos demonstram a evolução dos vírus nas populações humanas e animais. Em um deles, observou-se como o vírus da mixomatose dos coelhos evoluiu após a sua introdução na Austrália. A mixomatose é uma doença produzida por um poxvírus, cujos hospedeiros naturais são os coelhos americanos do gênero *Sylvilagus*. Essa enfermidade é conhecida desde 1896, e a transmissão ocorre mecanicamente por insetos. Nos hospedeiros naturais, a infecção produz fibromas localizados e benignos. Porém, ao contrário da enfermidade branda produzida nos coelhos americanos, o vírus do mixoma produz uma infecção letal nos coelhos europeus do gênero *Oryctolagus*.

Nas primeiras décadas do século passado, coelhos europeus foram introduzidos da Austrália propositalmente e, como não existiam predadores naturais, esses animais se reproduziram rapidamente, tornando-se uma praga para a agricultura e pecuária. Assim, em 1950, um programa de controle biológico dos coelhos com o vírus da mixomatose foi aplicado naquele país com o objetivo de solucionar o problema da superpopulação.

A cepa viral utilizada era oriunda do Brasil, isolada pelo Instituto Oswaldo Cruz em 1911. Inicialmente, a disseminação do vírus não foi ampla e permaneceu restrita aos *habitats* onde era introduzido, sem disseminação para ecossistemas vizinhos. Porém, observaram-se, posteriormente, centenas de coelhos doentes em locais muito distantes dos locais originais de introdução do vírus. A doença se distribuiu principalmente pelas margens dos grandes rios, onde os mosquitos eram mais abundantes. O verão seguinte foi úmido, e a enfermidade se disseminou rapidamente, resultando em mortalidade de até 99%. No entanto, no ano seguinte, observou-se que uma variante menos virulenta do vírus estava gradativamente substituindo a cepa original de alta virulência.

A virulência da cepa original e das cepas de campo isoladas na Austrália foi determinada em coelhos de laboratório e a cada isolado se atribuiu um grau de virulência entre I e V. A cepa original foi 100% letal em 11 a 13 dias após a inoculação (virulência grau I). Algumas das cepas de campo produziram uma letalidade entre 70-95%, com média de sobrevivência de 17 a 20 dias (virulência grau III). Outras cepas matavam menos de 50% dos coelhos infectados e produziam uma doença mais benigna (virulência grau IV). Após dois anos, todos os vírus de campo recuperados na Austrália possuíam grau III.

A seleção de cepas menos letais ocorreu em consequência da transmissão do vírus para os mosquitos, que foi prolongada para os vírus com virulência de grau III pela maior sobrevivência dos coelhos. Como consequência, os animais infectados produziam vírus por mais tempo, dando maior oportunidade aos mosquitos de se contaminar e transmitir a doença. Por outro lado, os coelhos infectados com a cepa original de grau I morriam rapidamente, e o ciclo de transmissão era interrompido.

A população de coelhos na Austrália também sofreu uma seleção para a resistência à mixomatose. A nova geração de coelhos descendeu dos 10% da população original que sobreviveu à doença. Durante sete anos, antes de começarem os surtos de mixomatose na primavera, coelhos jovens eram capturados nas áreas endêmicas e mantidos em cativeiro até atingirem a idade

adulta e os níveis de anticorpos maternos desaparecerem. Esses coelhos foram desafiados com uma cepa de virulência grau III. A mortalidade foi superior a 90% no primeiro ano e somente 30% no sétimo ano.

Embora a mixomatose tenha sido introduzida deliberadamente na Austrália, pode-se considerar que esse foi um caso de enfermidade emergente. Humanos infectaram coelhos europeus com o vírus da mixomatose, uma espécie na qual o vírus produz uma doença muito mais severa. A emergência de uma enfermidade pode estar relacionada com uma mudança evolutiva no agente causal, porém a enfermidade pode emergir mesmo na ausência de mutações virais.

No caso da mixomatose na Austrália, o vírus evoluiu, reduzindo a sua virulência. No entanto, não há um consenso de que todos os vírus evoluem no sentido da atenuação. É muito comum se considerar que os vírus evoluem para uma forma inofensiva para o seu hospedeiro, o que, provavelmente, poderia ser melhor para o futuro da população viral. Aos parasitas interessa não produzir muitos danos na população hospedeira, para que esses sobrevivam e permitam a sua amplificação e transmissão. Contudo, o êxito evolutivo de uma espécie depende essencialmente da geração de uma descendência numerosa, e isso não está necessariamente associado com atenuação da doença nos hospedeiros.

2.6.3 Vírus da influenza

Os vírus da influenza têm utilizado uma série de estratégias e alterações evolutivas que permitem a sua contínua circulação mesmo em populações com certo grau de imunidade. Existem razões evidentes pelas quais se estuda muito esses vírus: ocorreram quatro pandemias de influenza em um século e, na pandemia de 1918, morreram entre 20 e 50 milhões de pessoas.

O vírus da influenza é um ortomixovírus, possui envelope e seu genoma é composto por oito segmentos de RNA de sentido negativo, a maioria dos quais codifica somente uma proteína. O envelope viral possui duas glicoproteínas: a hemaglutinina (16 tipos) e a neuraminidase (nove tipos), e as cepas são designadas conforme

a composição da superfície viral por estas proteínas (H3N2, H5N1, H3N8).

A hemaglutinina (HA) é a proteína que se liga a moléculas da superfície celular que possuem ácido siálico, que servem como receptores para o vírus. A HA é também a proteína que induz a produção de anticorpos neutralizantes e protetores pelo hospedeiro. A neuraminidase (NA) atua durante o egresso do vírus, clivando o ácido siálico dos glicoconjugados e permitindo, dessa maneira, que a progênie viral seja liberada da célula.

Os vírus da influenza são mestres nas mudanças genéticas e antigênicas. Ao se estudar os diferentes isolados, são observadas variações antigênicas pontuais e progressivas na HA. Essas pequenas variações denominam-se *drift* antigênico (pode ser traduzido como substituição genética, principalmente por mutações em ponto) e permitem ao vírus reinfetar uma população parcialmente imune, que ainda possui anticorpos produzidos por uma infecção recente, mantendo o vírus circulante na população. Contrastando com essas variações pequenas, as alterações radicais na HA e NA denominam-se *shift* (troca), e ocorrem pelo intercâmbio dos respectivos genes entre dois vírus da influenza quando estes co-infectam um mesmo hospedeiro. Esses *shifts* antigênicos foram responsáveis pelas pandemias de 1957 e 1968, e acredita-se que são produzidos periodicamente pela criação conjunta de aves e suínos. Ao contrário, os segmentos genéticos do vírus que causou a pandemia de 1918 se originaram completamente de um ancestral aviário. Além do *drift* e *shift*, são detectadas inserções de sequências e outros mecanismos que permitem o processamento proteolítico da HA, alterando o tropismo tecidual e a patogenicidade.

Assim, os vírus da influenza evoluem por meio de dois mecanismos principais: mutações em ponto, que conferem pequenas alterações antigênicas; e reassortimento, que proporciona grandes alterações antigênicas e/ou de virulência. A espécie animal que geralmente abriga os eventos de reassortimento é a suína, que pode ser infectada tanto por vírus aviários como por vírus humanos ou suínos.

Em 2005, foi publicado um artigo que descreve como o vírus que ocasionou a pandemia de

1918 foi recriado em laboratório. O mais marcante deste fato é que esta pandemia ocorreu muito antes da identificação do vírus da influenza, que somente foi isolado no princípio dos anos 1930. Os segmentos genômicos de RNA do vírus foram recuperados de amostras de pulmão fixadas em formalina, que estavam guardadas, e também de tecidos de uma vítima da pandemia de 1918 que havia sido enterrada na *permafrost* (terra permanentemente congelada, no Alasca). Por meio de metodologia de genética reversa, foi possível recriar o vírus em laboratório e estudar algumas de suas características. As seqüências dos genes do vírus de 1918 são relacionadas com o vírus H1N1 aviário, mais do que com qualquer outro isolado H1N1 de mamífero. Esses achados aumentaram a preocupação atual com os casos de influenza de origem aviária pelo vírus H5N1, que pode infectar humanos. Até o momento, não há evidências de que este vírus possua a habilidade de ser transmitido entre humanos, pois a replicação viral é confinada ao trato respiratório inferior e provoca a morte de pessoas em poucos dias. Porém, à medida que o número de pessoas infectadas aumente, a probabilidade de mutações que permitam a transmissão entre humanos também aumentará.

Os três tipos de alterações evolutivas descritas, *drift* e *shift* antigênico e inserções na hemaglutinina conferem ao vírus da influenza uma maior aptidão biológica, uma vez que podem reinfectar uma população parcialmente imune ou ampliar o tropismo tecidual, produzindo uma progênie mais abundante.

2.6.4 Parvovírus canino

O parvovírus canino (CPV) surgiu subitamente como causa de enfermidade de cães na década de 1970 e, em 1978, foi diagnosticado simultaneamente em vários países, causando enfermidade grave na população canina. Este vírus se originou a partir de um parvovírus já conhecido anteriormente, o vírus da panleucopenia felina (FPLV), por mutações em ponto na proteína VP2 do capsídeo, sítio de ligação do vírion aos receptores celulares. Assim, o novo vírus foi capaz de infectar e, posteriormente, se adaptar a uma nova espécie hospedeira.

Estudos das mutações responsáveis pelo cruzamento da barreira entre espécies indicam que mudanças em apenas dois códons (posições 93 e 323) da VP2 do FPLV possibilitaram ao vírus infectar cães e linhagens celulares de origem canina. Posteriormente foi demonstrado que as mesmas substituições desses códons no CPV pelos correspondentes do FPLV eliminam a predileção do vírus pela espécie canina.

Como a população canina não possuía anticorpos contra o novo agente, os primeiros seis meses após o surgimento do CPV foram seguidos de uma pandemia mundial, que produziu gastroenterite hemorrágica grave com altos índices de mortalidade em cães. Esse agente foi denominado CPV-2 e, nos anos seguintes, sofreu algumas alterações que permitiram uma adaptação maior aos hospedeiros caninos, originando os biótipos CPV-2a e CPV-2b. Um terceiro biótipo, o CPV-2c, tem sido descrito na população canina nos últimos anos. Acredita-se que o CPV não perdeu a sua capacidade inicial de infectar felinos, pois a infecção natural tem sido demonstrada em gatos domésticos. Os CPVs que existem atualmente circulando na população canina são menos virulentos do que os originais, provavelmente refletindo uma evolução do vírus no sentido de se adaptar aos novos hospedeiros.

2.7 Conclusões

Os vírus são os mestres das mudanças e evolução genética. É importante conhecer as estratégias que esses agentes utilizam para melhor reconhecer enfermidades produzidas por vírus emergentes e por vírus conhecidos que produzam doenças atípicas. À medida que se intensifica a exploração pecuária e se aumenta a densidade dos animais, torna-se necessária a implementação de programas sanitários especiais que reduzam a possibilidade de introdução de novos patógenos nas criações. É importante considerar também que todos os vírus são importantes, mesmo os que aparentemente não produzem enfermidades no homem ou em animais, pois esses agentes podem alterar a sua gama de hospedeiros e produzir enfermidades devastadoras. Exemplos recentes incluem a infecção de humanos, cães e

felinos com novos subtipos do vírus da influenza, o surgimento do SARS-CoV, que matou centenas de pessoas na Ásia e a inusitada infecção de mamíferos marinhos com variantes do CDV, causando alta mortalidade no mar Mediterrâneo. Assim, tendo em vista a sua plasticidade e capacidade de adaptação e evolução, nenhum vírus pode ser considerado sem importância.

3 Bibliografia consultada

ADAMI, C. What is complexity? **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v.24, p.1085-1094, 2002.

ADAMI, C.; OFRIA, C.; COLLIER, T.C. Evolution of biological complexity. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p.4463-4468, 2000.

BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v.69, p.3-13, 1999.

BELSHE, R.B. The origins of pandemic influenza: lessons from the 1918 virus. **The New England Journal of Medicine**, v.353, p.2209-2211, 2005.

CARROLL, S.B. Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. **Nature**, v.409, p.1102-1109, 2001.

DeFILIPPIS, V.R.; VILLARREAL, L.P. Virus evolution. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.13, p.353-370.

DOMINGO, E. HOLLAND, J. RNA Virus mutations and fitness for survival. **Annual Review of Microbiology**, v.51, p.151-178, 1997.

GIBBS, A.J.; CALISHER, C.H.; GARCIA-ARENAL, F. **Molecular basis of virus evolution**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995. 603p.

LEVINE, A.J. The origins of virology. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.1, p.3-18.

MURPHY, F.A. et al. Viral genetics and evolution. In: _____. **Veterinary Virology**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap.4, p.61-80.

NOVELLA, I.S. et al. Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.5841-5844, 1995.

ORR, H.A. Adaptation and the cost of complexity. **Evolution: international journal of organic evolution**, v.54, p.13-20, 2000.

PARRISH, C.R. Emergence, natural history and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. **Advances in Virus Research**, v.38, p.403-450.

PARRISH, C.R. et al. Global spread and replacement of canine parvovirus strains. **The General Journal of Virology**, v.69, p.1111-1116, 1988.

PARRISH, C.R. et al. Natural variation of canine parvovirus. **Science**, v.230, p.1046-1048.

PEARSON, H. Genetics: what is a gene? **Nature**, v.25, p.398-401, 2006.

PLAGEMANN, P.G.W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.903-908, 2003.

RAGER, M. et al. Polyploid measles virus with hexameric genome length. **The EMBO Journal**, v.21, p.2364-2372, 2002.

SELLA, G.; HIRSH, A.E. The application of statistical physics to evolutionary biology. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.102, p.9541-9546, 2005.

TRUYEN, U. et al. There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.103-122, 1995.

WEBSTER, R.G. et al. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.3-8, 2006.

REPLICAÇÃO VIRAL

Eduardo Furtado Flores & Luiz Carlos Kreutz

5

1 Introdução	109
2 Conceitos básicos: infecção, susceptibilidade, permissividade	109
3 Etapas da replicação	110
3.1 Adsorção	111
3.2 Penetração	114
3.2.1 Penetração por fusão na superfície celular	114
3.2.2 Penetração após endocitose	114
3.2.3 Outros mecanismos de penetração	117
3.3 Etapas após a penetração	118
3.3.1 Desnudamento	118
3.3.2 Movimentação intracelular	118
3.3.3 Penetração nuclear	119
3.4 Expressão gênica	119
3.5 Replicação do genoma	121
3.5.1 Replicação dos vírus DNA	122
3.5.2 Replicação dos vírus RNA	126
3.6 Morfogênese, maturação e egresso	131
3.6.1 Maturação intracelular (citoplasmática ou nuclear)	131
3.6.2 Maturação por brotamento em membranas celulares	132
4 Bibliografia consultada	134

1 Introdução

A produção de progênie genética e fenotipicamente semelhante ao vírus parental se constitui no evento central da existência e perpetuação dos vírus na natureza. Por isso, por uma visão evolutiva simplista, a multiplicação dos vírus possui uma finalidade única e objetiva: produzir progênie viável. As alterações da fisiologia celular, associadas com as infecções virais – que podem resultar em doença e até em morte do hospedeiro –, são meras conseqüências das interações do vírus com as células; interações que são absolutamente necessárias para o agente atingir esse objetivo.

Os vírus são os organismos mais simples que existem: os mais simples são compostos por uma molécula de ácido nucléico envolta por uma camada protéica. Quando estão fora de células vivas, os vírus são estruturas químicas, desprovidas de qualquer atividade biológica. Não possuem metabolismo próprio, não são capazes de produzir autonomamente nem os componentes mínimos para a sua multiplicação. Por isso, necessitam utilizar as organelas e o metabolismo celular para replicar o seu genoma e produzir as proteínas necessárias para a construção de novas partículas víricas. Esses agentes só adquirem atividade biológica dentro de células vivas. Mesmo os vírus mais complexos e evoluídos são dependentes de processos biológicos celulares para a sua multiplicação. Por isso, os vírus são, tradicionalmente, classificados como parasitas intracelulares obrigatórios.

O termo *replicação* – que em sua origem significa a síntese de moléculas de ácidos nucléicos a partir de um molde – tem sido universalmente utilizado para designar o processo de multiplicação dos vírus como um todo e assim será utilizado neste texto. Este capítulo abordará os aspectos gerais da replicação dos vírus; os aspectos peculiares de cada família serão abordados nos capítulos específicos.

2 Conceitos básicos: infecção, susceptibilidade e permissividade

A palavra *infecção* deriva do latim *infere*, que significa inserir, penetrar, introduzir. No entanto,

embora a *penetração* (ou infecção, no significado estrito da palavra) seja uma etapa indispensável à replicação viral, por permitir a introdução do material genético na célula, o termo infecção possui um significado mais amplo em Virologia. A penetração do vírus na célula, por si só, não assegura a produção de progênie viral, pois outras etapas intracelulares são necessárias. Por isso, o termo infecção tem sido utilizado para definir o processo replicativo do agente como um todo, incluindo a penetração e as etapas subseqüentes da replicação. A série de etapas que inicia com a penetração e culmina com a liberação de progênie viral é também denominada ciclo replicativo.

Se todas as etapas da infecção forem completadas e resultarem na produção de progênie viral viável, a infecção é dita *produtiva*. Se, após a penetração, o ciclo replicativo for interrompido em alguma etapa, a infecção é dita *abortiva*. Susceptibilidade e permissividade são propriedades complementares que definem a capacidade das células de suportar as etapas da replicação viral. *Susceptibilidade* refere-se à capacidade das células de serem infectadas naturalmente pelo vírus, enquanto *permissividade* refere-se às condições intracelulares para a ocorrência da multiplicação viral. Assim, as células que suportam o ciclo replicativo completo, após a infecção natural, são simultaneamente *susceptíveis* (permitem a penetração) e *permissivas* (permitem a ocorrência das etapas intracelulares). Essas duas propriedades, no entanto, nem sempre ocorrem concomitantemente em uma célula. Em algumas situações, células permissivas podem ser não susceptíveis à infecção, devido à falta de receptores para a adsorção e penetração do vírus. Essas células somente poderão ser alvo de uma replicação produtiva se o material genético viral for introduzido artificialmente (i.e., por transfecção). Por outro lado, células susceptíveis à infecção natural podem apresentar um bloqueio intracelular em alguma etapa da replicação, sendo denominadas *não-permissivas*. Se esse bloqueio ocorrer após algumas etapas do ciclo, essas células são ditas *semipermissivas*. Para simplificar, neste texto, o termo susceptibilidade será utilizado para definir a capacidade das células de suportar todas as etapas da replicação viral após a infecção natural.

A susceptibilidade é determinada pela interação de múltiplos fatores virais e celulares. Em razão da complexidade dessas interações, as espécies animais (e também as células de cultivo) apresentam uma ampla variação de susceptibilidade a diferentes vírus. O termo espectro de hospedeiros (*host range*) é utilizado para definir o conjunto de espécies animais (*host range in vivo*) ou de diferentes células (*host range in vitro*) que podem ser infectados naturalmente por um determinado vírus. O termo *tropismo* refere-se à predileção do vírus por determinadas células, tecidos ou órgãos do hospedeiro para se multiplicar. O principal fator celular – mas não o único – determinante da susceptibilidade e do tropismo é a presença de moléculas específicas na superfície celular, denominadas genericamente de *receptores virais*. Os receptores virais são moléculas da membrana plasmática que desempenham funções diversas na biologia das células, das quais os vírus se utilizam para se ligar e iniciar a infecção.

3 Etapas da replicação

A multiplicação dos diferentes vírus apresenta várias etapas em comum, apesar da diversidade estrutural, do tipo e da organização genômica e das diferentes estratégias de replicação. Essas etapas ocorrem de forma ordenada e seqüencial e envolvem interações complexas entre as proteínas e o genoma viral com organelas e macromoléculas celulares. O ciclo replicativo de todos os vírus inclui necessariamente as etapas de adsorção, penetração, desnudamento, expressão gênica (transcrição e tradução), replicação do genoma, morfogênese/maturação e egresso. Essas etapas estão ilustradas esquematicamente na Figura 5.1.

A maior parte dos conhecimentos sobre os mecanismos biológicos e moleculares da multiplicação dos vírus somente foi obtida a partir do estabelecimento dos cultivos celulares. Após a inoculação do vírus em células cultivadas *in vitro*, os cultivos são deixados em repouso para que as partículas víricas iniciem gradativamente a entrar em contato com a superfície celular. Essa etapa é denominada *adsorção*. Imediatamente após a adsorção, os vírions penetram nas células

e iniciam a infecção. A coleta e quantificação do vírus presente no sobrenadante dos cultivos a diferentes intervalos, após a inoculação, permite a identificação de três fases: eclipse, maturação e inativação (Figura 5.2).

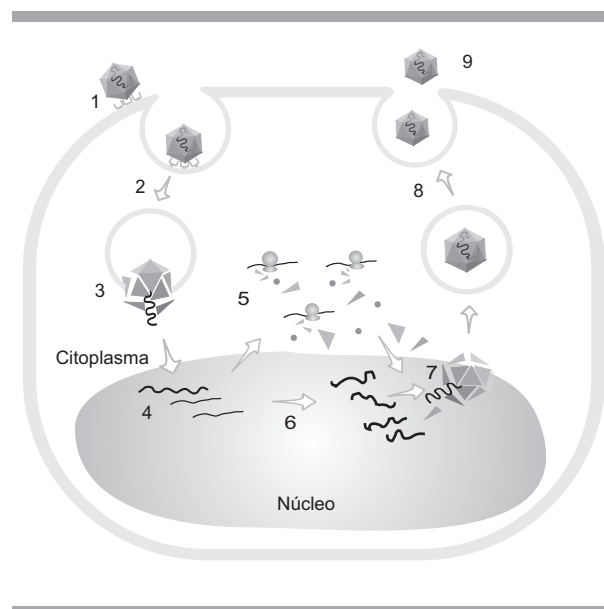


Figura 5.1. Representação esquemática do ciclo replicativo de um vírus DNA. 1) Adsorção; 2) Penetração; 3) Desnudamento; 4) Transcrição dos genes virais; 5) Tradução dos RNA mensageiros (mRNA) e produção das proteínas virais; 6) Replicação do genoma; 7) Morfogênese; 8-9) Egresso.

Após a remoção do material que foi inoculado e durante um período variável, apenas uma pequena quantidade de infectividade pode ser detectada no sobrenadante. Esse período em que o vírus virtualmente desaparece é denominado *eclipse* e coincide com as fases iniciais da infecção. A duração da fase de eclipse depende do ciclo replicativo de cada vírus, que varia entre quatro a seis horas nos picornavírus e mais de 40 horas em alguns herpesvírus. A fase de eclipse é seguida por um período em que a progênie viral vai sendo produzida e gradativamente liberada pelas células, acumulando-se no sobrenadante (Figura 5.2). Essa fase é denominada *maturação*. Nos vírus que produzem lise celular, a quantidade de vírus no sobrenadante aumenta até atingir um platô, que coincide com a perda da integridade funcional e estrutural das células. A partir daí, o *título* viral no sobrenadante tende a decrescer gradativamente – dependendo do vírus – devido à ina-

tivação da infectividade das partículas víricas e à perda da viabilidade das células. Essa fase é denominada *inativação*. Em infecções por vírus não-líticos, as células podem produzir progênie viral indefinidamente, mas o balanço entre a produção e a inativação não permite que o título viral no sobrenadante aumente indefinidamente.

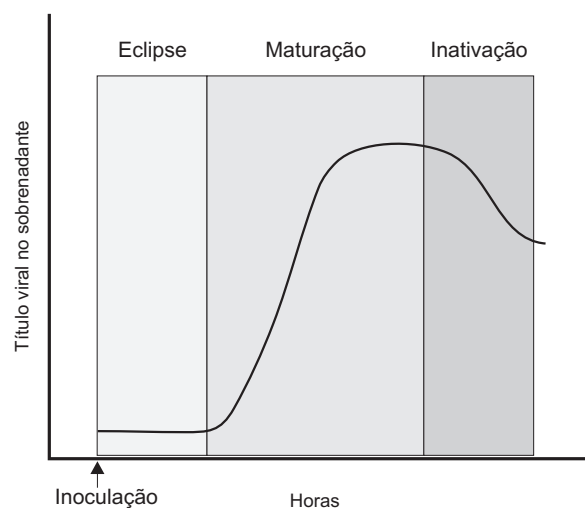


Figura 5.2. Fases da infecção por vírus líticos em cultivo celular: eclipse, maturação e inativação.

3.1 Adsorção

A primeira etapa da replicação é a ligação específica das partículas víricas na superfície das células hospedeiras – evento denominado *adsorção* –. Essa ligação é mediada por proteínas da superfície dos vírions (*viral attachment proteins*, VAPs) que interagem com os receptores na superfície das células. Nos vírus sem envelope, a função de ligação é exercida pelas proteínas do capsídeo; nos vírus envelopados, pelas glicoproteínas do envelope. Os receptores celulares para os vírus são geralmente proteínas (glicoproteínas) ou carboidratos (presentes em glicoproteínas ou em glicolipídios da membrana). Em comparação com os receptores protéicos, os carboidratos são menos específicos, pois podem estar presentes em uma variedade de moléculas de membrana. Alguns vírus são estritamente dependentes de um receptor específico (exemplos: rinovírus, polioví-

rus, vírus da febre aftosa [FMDV]) enquanto outros podem utilizar receptores alternativos para iniciar a infecção (exemplo: herpesvírus, alguns togavírus). A capacidade de utilizar mais de um receptor para iniciar a infecção pode representar uma vantagem evolutiva, pois oferece a esses vírus a possibilidade de infectar diferentes tipos de células e/ou hospedeiros.

Os receptores celulares para vírus são moléculas de membrana que desempenham funções diversas na biologia celular e que, ocasionalmente, servem para os vírus se ligarem e iniciarem a infecção. Os receptores celulares para vários vírus animais já foram identificados (Tabela 5.1). Na maioria dos casos, a presença dos receptores determina o espectro de hospedeiros e o tropismo do vírus. Conseqüentemente, a presença e distribuição dos receptores também são determinantes fundamentais da patogenia da infecção. O número de receptores na superfície de uma célula parece ser extremamente variável. Essas moléculas podem ser raras e específicas de algumas células ou abundantes e amplamente distribuídas em várias células.

Em alguns casos, as interações entre as VAPs e os receptores não são suficientes para permitir o início da infecção. Nesses casos, a interação dos vírions com proteínas adicionais da membrana celular, denominadas *co-receptores*, é necessária para que ocorra a penetração. Por exemplo, a interação inicial dos adenovírus com a célula hospedeira envolve a ligação da proteína *fiber* com um receptor celular. Essa interação não é suficiente para assegurar a penetração, mas é necessária para que a proteína viral *penton* interaja com uma segunda molécula da membrana celular – a vitronectina – e resulte em penetração. O vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) liga-se ao receptor CD4 e utiliza como co-receptor um receptor de citocina. A interação inicial do vírus do herpes simplex humano (HSV-1) com as células é mediada pela interação da glicoproteína gC (ou gB) com o sulfato de heparina na superfície celular. A fusão e penetração, no entanto, dependem de interações secundárias entre a gD (e também a gH) com outras moléculas da membrana.

Tabela 5.1. Receptores celulares e mecanismos de penetração dos principais vírus animais

	Família	Vírus	Receptor Viral	Forma/local de Penetração
Vírus DNA	<i>Herpesviridae</i>	Herpes simplex	Sulfato de heparina/receptor homólogo ao fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento Neuronal (NGF)	Fusão na membrana plasmática
		Pseudoraiça	Sulfato de heparan (HS), proteoglicanos (HSPG) e coreceptores	Fusão na membrana plasmática
	<i>Adenoviridae</i>	Adenovírus 2	Receptor para adenovírus e vírus Coxsackie B (CAR)	Endocitose dependente de clatrina
	<i>Poxviridae</i>	Vaccinia	Fator de crescimento epidermal (EGF)	Membrana plasmática e/ou macropinosomo
	<i>Polyomaviridae</i>	SV-40	Moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I	Endocitose caveolar e/ou retículo endoplasmático
	<i>Papillomaviridae</i>	Papilomavírus bovino	Integrina α -6 e moléculas semelhantes ao heparan	Endocitose dependente de clatrina
	<i>Parvoviridae</i>	Parvovírus canino	Receptor da transferrina	Endossomos
Vírus RNA	<i>Asfarviridae</i>	Peste suína africana	nd ^a	Endossomos
	<i>Arteriviridae</i>	Vírus elevador da desidrogenase láctica	Moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II	Endossomos
	<i>Coronaviridae</i>	Vírus da Hepatite dos Murinos	Glicoproteína biliar dos murinos/ antígeno carcinoembrionário	Endossomos
		Coronavírus humano 229E	CD13 (Aminopeptidase)	Membrana plasmática
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Vírus da influenza	Ácido siálico	Endocitose dependente de clatrina
	<i>Paramyxoviridae</i>	Vírus do sarampo	CD46	Membrana plasmática
	<i>Togaviridae</i>	Semliki Forest	Moléculas do MHC classe II	Endocitose dependente de clatrina
	<i>Flaviviridae</i>	Vírus da diarreia viral bovina	CD46 bovino	Endossomos
	<i>Rhabdoviridae</i>	Vírus da raiva	Receptor da neurotropina (p75NTR)	Endocitose dependente de clatrina
	<i>Filoviridae</i>	Vírus Ebola e Marburg	Receptor folato α (FR- α)	Caveola
	<i>Retroviridae</i>	HIV-1	CD4 e receptor de citocinas	Membrana plasmática
	<i>Bunyaviridae</i>	Vírus Hantaan	Integrinas (β_3)	Endocitose dependente de clatrina
	<i>Picornaviridae</i>	Vírus da febre aftosa	Integrinas (α_v)	Endocitose
	<i>Caliciviridae</i>	nd	nd	Endossomos
	<i>Reoviridae</i>	Reovírus	Ácido siálico e molécula 1 de adesão juncional (JAM 1)	Endossomos
		Rotavírus	Integrinas α V β 3 e proteínas cognatas do choque térmico (hscp70)	Membrana citoplasmática (<i>lipid rafts</i>)
* Adaptado de Klasse et al. (1998); de Pelkmans e Helenius (2003) e referências selecionadas. ^a CAR: receptor de vírus coxsackie B e adenovírus. ^b não determinado.				

Em cultivo celular – e provavelmente também *in vivo* – o contato de um vírion com uma célula é um evento que ocorre ao acaso. Ou seja, a célula hospedeira não atrai a partícula vírica a distância. Uma vez em contato com a superfície da célula, componentes externos dos vírions interagem quimicamente (interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio etc.) com moléculas da membrana plasmática, podendo resultar ou não em penetração e início da infecção.

O processo de adsorção é independente de energia e do metabolismo celular e ocorre com a mesma eficiência à temperatura corporal ou a 4°C. Embora seja de alta especificidade, a interação de uma molécula de VAP com o receptor é de fraca intensidade e, isoladamente, não seria suficiente para proporcionar a ocorrência das etapas seguintes da penetração. Para isso, é necessária a ocorrência simultânea de dezenas ou centenas dessas interações. Ou seja, a adsorção viral na superfície celular é um processo cooperativo, resultante de múltiplas interações entre proteínas da superfície dos vírions com os seus respectivos receptores.

Embora a adsorção dos vírions à superfície celular seja a etapa inicial e indispensável para o início da replicação, esse evento nem sempre resulta em infecção produtiva. É provável que um número muito grande de interações entre vírions e células não resulte em penetração, seja pela ausência de receptores específicos para o vírus, seja pela debilidade dessas interações. Partículas víricas podem se ligar à superfície da célula e não serem internalizadas. Outro cenário possível é a ligação, porém com internalização e liberação do nucleocapsídeo em compartimentos inadequados para a replicação (p. ex.: lisossomos). É possível também que vírions sejam internalizados em células que não possuam os componentes necessários à continuação do ciclo. Resumindo, a ligação dos vírions a moléculas da membrana celular é uma etapa absolutamente necessária, porém nem sempre suficiente para garantir a continuidade do ciclo replicativo.

Além de proporcionar o contato inicial com a célula, as interações dos vírions com os receptores também podem desencadear alterações es-

truturais nas proteínas de superfície dos vírions. Para alguns vírus (p. ex.: poliovírus), essas alterações são absolutamente necessárias para a penetração, desnudamento e continuação do ciclo. Por isso, além de servir para a ligação inicial, os receptores, para alguns vírus, podem ser necessários para a desestabilização das partículas víricas e conseqüente liberação do genoma no interior da célula. Nos vírus envelopados, a ligação ao receptor pode induzir alterações conformacionais nas VAPs, que promovem a fusão do envelope com a membrana celular. No caso do HIV-1, a ligação do vírion ao receptor CD4 é necessária para estimular a capacidade fusogênica da glicoproteína TM.

Em alguns casos, a ligação dos vírions aos receptores também pode induzir sinais químicos intracelulares, que podem estar envolvidos na facilitação da endocitose, no transporte intracelular dos nucleocapsídeos e até mesmo na sobrevivência da célula. Por outro lado, a penetração e a posterior replicação viral ativam mecanismos imunológicos de defesa, como a produção de interferon do tipo I (IFN-I).

A distribuição dos receptores na superfície apical das células parece ser aproximadamente uniforme. A penetração dos vírions, no entanto, parece ocorrer preferencialmente em alguns locais. Isso ocorre porque a ligação das partículas víricas aos receptores é acompanhada de movimentos laterais dessas moléculas, resultando na aglomeração dos receptores em determinados locais. Esses locais são facilmente observáveis sob microscopia eletrônica (ME) e aparecem como espessamentos da membrana plasmática. Esses espessamentos são decorrentes do acúmulo de uma proteína denominada *clatrina*, envolvida em sistemas de transporte intracelular por vesículas. A aglomeração dos vírus que penetram por endocitose mediada por receptores, em determinados locais, precede e promove a invaginação da membrana, com a conseqüente formação da vesícula endocítica contendo os vírions em seu interior. A endocitose mediada por receptores é um processo fisiológico utilizado pelas células para internalizar diversas moléculas, das quais os vírus tiram proveito para iniciar a infecção.

3.2 Penetração

A *penetração* é a etapa subsequente à adsorção e envolve a transposição da membrana plasmática, permitindo a introdução do nucleocapsídeo (genoma viral + proteínas) no interior da célula, local onde ocorrerão a expressão gênica e a replicação do genoma. A transposição da membrana pode ocorrer na superfície celular ou já no interior do citoplasma, a partir de vesículas produzidas por endocitose, fagocitose ou macropinocitose. Dependendo da biologia do vírus, a penetração pode ocorrer sem prévia *internalização* (se ocorrer na superfície celular) ou após *internalização* (se ocorrer a partir de vesículas intracitoplasmáticas). No entanto, a *internalização* de vírions em vesículas endocíticas não assegura a ocorrência de penetração. A *internalização* em vesículas ou a penetração direta são processos que ocorrem imediatamente após a ligação dos vírions aos receptores da membrana plasmática.

Ao contrário da adsorção, a *internalização* e penetração são processos dependentes de energia e não ocorrem eficientemente a 4°C. Uma forma de sincronizar o início da infecção viral *in vitro* é realizar adsorção a 4°C durante uma hora (ocorre adsorção sem penetração) e, a seguir, transferir o cultivo para 37°C, quando ocorrerá a penetração simultânea das partículas víricas adsorvidas.

As etapas iniciais da infecção viral têm sido estudadas com o recurso da ME e com a utilização de químicos que inibam a *internalização* e/ou a acidificação de vesículas intracelulares (i.e., endossomos). Dessa forma, quando a infecção por um vírus é prevenida por substâncias inibidoras da endocitose, deduz-se que a sua penetração dependa de prévia *internalização*; quando a infecção é inibida por agentes que previnam a acidificação dos endossomos, conclui-se que o pH ácido dessas organelas seja necessário para a penetração.

Em geral, os vírus penetram nas células utilizando um (ou alternativamente mais de um) dos seguintes mecanismos: a) penetração por fusão na superfície celular; b) penetração após endocitose (mediada por clatrina, caveolina ou agrupamentos de lipídios); c) fagocitose. Esses mecanismos estão ilustrados na Figura 5.3.

3.2.1 Penetração por fusão na superfície celular

Alguns vírus com envelope (p. ex.: retrovírus, paramixovírus e herpesvírus) penetram na célula após fusão do envelope com a membrana plasmática, evento que ocorre na superfície celular (Figura 5.3A). A fusão resulta em um canal entre o interior da partícula e o compartimento citoplasmático, através do qual o nucleocapsídeo penetra no citoplasma. A fusão entre as membranas do envelope e a plasmática requer a ação de proteínas de fusão presentes no envelope dos vírions (p. ex.: glicoproteína TM nos retrovírus e F nos paramixovírus). Nesses vírus, o mecanismo de fusão ocorre sob pH neutro, ou seja, independente de acidificação, e, por isso, esses vírus são denominados *pH-independentes*.

A membrana plasmática não é a única barreira que o nucleocapsídeo viral deve ultrapassar para ter acesso aos locais intracelulares apropriados para a replicação. Algumas células possuem um citoesqueleto cortical espesso logo abaixo da membrana plasmática, o que impede o acesso de ribossomos e outras organelas à área imediatamente adjacente à membrana. Essas estruturas também dificultam a progressão dos nucleocapsídeos até as regiões mais internas da célula. Não obstante, os vírus que penetram por fusão na superfície celular desenvolveram estratégias para superar esses obstáculos e conseguir liberar os seus nucleocapsídeos nos locais adequados.

3.2.2 Penetração após endocitose

Esse mecanismo é característico da penetração de vários vírus envelopados (p. ex.: flavivírus e ortomixovírus) e de alguns vírus sem envelope (p. ex.: adenovírus, picornavírus e reovírus). A via endocítica parece ser o caminho mais adequado para a *internalização* dos vírus, pelos seguintes aspectos: a) a endocitose é um processo fisiológico comum à maioria das células; b) somente ocorre em células com transporte de membrana ativo, evitando a penetração em eritrócitos e plaquetas, onde a infecção seria improdutiva; c) os vírions podem se ligar em qualquer local da superfície celular para serem *internalizados*; d) a endocito-

se assegura a internalização e o transporte dos vírions aos locais de expressão gênica e replicação; e) a penetração a partir dos endossomos reduz os riscos de detecção pelo sistema imunológico, pois não deixa proteínas virais expostas na superfície celular; e f) o ambiente endossomal se acidifica gradativamente, o que auxilia na ativação dos mecanismos de fusão e penetração.

3.2.2.1 Endocitose mediada por clatrina

Os endossomos recobertos por clatrina são vesículas de aproximadamente 100 nm de diâmetro e se formam pela invaginação de pequenas regiões da membrana plasmática revestidas internamente por moléculas de clatrina (*clatrin-coated pits*). Quando examinadas sob ME, essas regiões

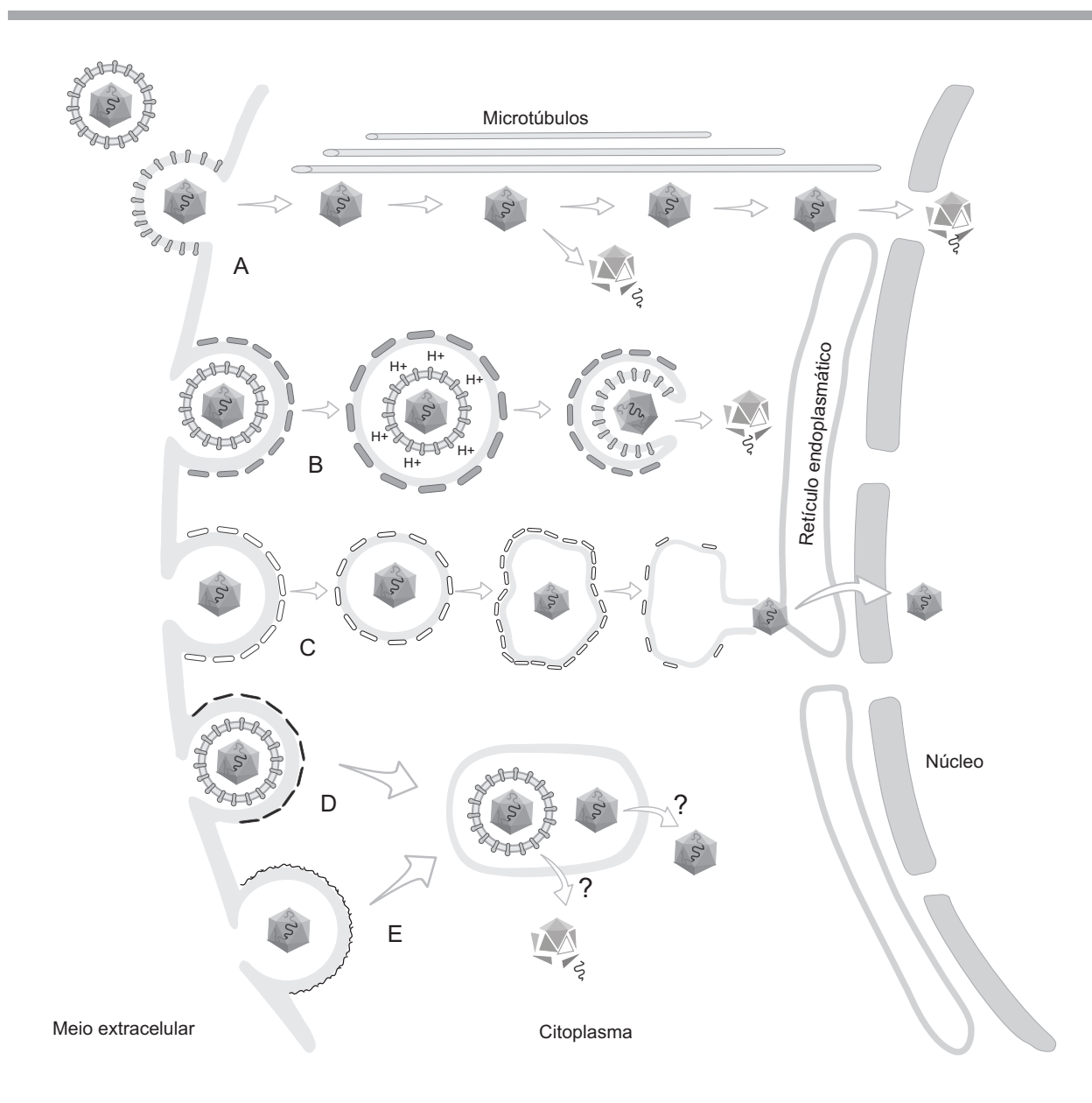


Figura 5.3. Principais mecanismos de penetração dos vírus nas células hospedeiras. A) Penetração na superfície celular, por fusão com a membrana plasmática; B) Penetração por fusão após endocitose mediada por clatrina; C) Penetração por fusão após endocitose mediada por caveolina; D-E) Penetração após endocitose mediada por agrupamentos de lipídios.

aparecem como espessamentos da membrana, adjacentes aos locais de ligação dos vírions. Após a invaginação, o revestimento de clatrina é removido e as vesículas trafegam em direção ao interior da célula. Nesse trajeto, o ambiente endossomal é gradativamente acidificado por meio de ATPases associadas à membrana, que bombeiam prótons H^+ para o seu interior. Nos endossomos tardios e lisossomos, o pH pode atingir 5,0 a 5,5. Dessa forma, os vírions internalizados por essa via são submetidos à redução gradativa do pH. Essa forma de penetração é a mais estudada e, provavelmente, a mais importante entre os vírus animais, sendo tratada com mais detalhes a seguir (Figura 5.3B).

Ao contrário da fusão e penetração dos vírus pH independentes, a fusão do envelope de muitos vírus com a membrana celular só ocorre sob pH baixo (5,5-6,5). Esses vírus são denominados *pH-dependentes* e não conseguem fundir e penetrar na superfície celular sob pH neutro. A acidificação progressiva dos endossomos proporciona condições para a fusão do envelope com a membrana endossomal, resultando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Embora vários vírus penetrem dessa forma, esse é um mecanismo particularmente bem caracterizado nos vírus da influenza. A proteína de fusão desses vírus (hemaglutinina, HA) é também a proteína responsável pela ligação aos receptores (ácido siálico). Após a ligação nos receptores, os vírions são internalizados por endocitose. A acidificação dos endossomos induz alterações conformacionais na HA que resultam na fusão do envelope com a membrana do endossomo. O pH baixo nos endossomos também facilita a dissociação dos nucleocapsídeos do restante do envelope, resultando na sua liberação no citoplasma. Nos vírus pH-dependentes, a penetração deve ocorrer no momento apropriado, pois a acidificação excessiva que ocorre após a fusão dos endossomos com os lisossomos pode inativar o vírus. Drogas que inibem a endocitose (óxido de fenilarsina) ou impedem a acidificação dos endossomos (monensina, cloroquina e cloreto de amônia) previnem a penetração de vírus pH-dependentes.

Os vírus sem envelope transpõem a membrana pela formação de canais proteináceos na

membrana endossomal (picornavírus) ou por lise/perturbação da integridade dessa membrana (adenovírus e reovírus). A acidificação progressiva dos endossomos e as interações com a membrana provocam alterações estruturais e desorganização do capsídeo, podendo ocorrer a dissociação de algumas proteínas. Nos picornavírus, o rearranjo das proteínas do capsídeo induzido pelo pH baixo, leva à formação de aberturas através das quais o genoma é translocado para o interior do citoplasma. As partículas víricas do reovírus, internalizados por endocitose, sofrem alterações estruturais e algumas proteínas do capsídeo são ativadas, tornando-se capazes de lisar ou permeabilizar a membrana do endossomo. Dessa forma, permitem a penetração dos capsídeos semidesintegrados. Nos adenovírus, o capsídeo sofre alterações estruturais pela exposição ao pH progressivamente baixo, resultando na desorganização da partícula e na ativação das proteínas fibra e penton. Essas proteínas participam da lise ou da permeabilização da membrana endossomal, permitindo a penetração do complexo nucleoproteína no compartimento intracelular.

3.2.2.2 Endocitose mediada por caveolina

As caveolas são pequenas invaginações em forma de cantil, que são formadas na membrana plasmática de diversos tipos de células. As caveolas podem ser internalizadas com auxílio da actina e, até o presente momento, não há evidências de que o seu conteúdo seja entregue à via endocítica, ou seja, constituem um mecanismo independente de internalização. As caveolas internalizadas são transportadas até a região perinuclear, próxima ao retículo endoplasmático (RE). Recentemente, evidenciou-se que o vírus sínio 40 (SV-40) utiliza essa via para a internalização e penetração (Figura 5.3C). Após a ligação aos receptores, os vírions se deslocam lateralmente na superfície celular até serem capturados por caveolas. As caveolas são, então, circundadas parcialmente por fibras de actina, conferindo à vesícula uma aparência de cantil. Posteriormente, a vesícula caveolar, contendo os vírions, é entregue aos caveossomos,

que são organelas de pH neutro preexistentes no citoplasma, ricas em caveolina e colesterol. Após algumas horas da infecção, os caveossomos liberam túbulos membranosos repletos de vírions, que trafegam ao longo dos microtúbulos até o RE. Posteriormente, as partículas virais deixam essa organela, entram no citosol e penetram no núcleo através dos poros nucleares. Essa via de penetração parece não ser exclusiva do SV-40. Estudos recentes com o vírus ebola (filovírus), poliomavírus e echovírus (picornavírus) têm sugerido um mecanismo semelhante de penetração.

3.2.2.3 Endocitose mediada por agrupamento de lipídeos

Esfingolipídeos e/ou glicosfingolipídeos e moléculas de colesterol podem se associar lateralmente e formar microdomínios na membrana celular, denominados de *lipid rafts* (o termo *raft* denota as toras de madeira utilizadas na construção dejangadas). Esses microdomínios contêm proteínas específicas e participam de funções celulares, como o transporte de membrana, morfogênese e sinalização celular. A internalização dessas estruturas é independente do revestimento por clatrina e caveolina. Os vírions internalizados por essa via são direcionados aos endossomos, a partir dos quais ocorre penetração no compartimento citoplasmático. Essa via de penetração tem sido sugerida para o SV-40, em células que não contêm caveolina, e também para alguns picornavírus, papilomavírus e retrovírus (Figuras 5.3D e 5.3E).

3.2.3. Outros mecanismos de penetração

3.3.3.1 Fagocitose

O papel da fagocitose na penetração dos vírus nas células hospedeiras ainda não está esclarecido. No entanto, partículas do vírus da influenza já foram observadas em vesículas fagocíticas, e os poxvírus possivelmente utilizam essa via para a internalização e posterior penetração celular. Após a sua formação, os fagossomos se fusionam com os endossomos e lisossomos e são

acidificados, potencializando a capacidade de fusão e penetração dos vírions pH-dependentes.

3.3.3.2 Macropinocitose

A macropinocitose é um processo celular não específico (pode ocorrer na ausência de ligantes aos receptores) de internalização de volumes grandes de fluidos e de regiões de membrana. Substâncias internalizadas por essa via também são direcionadas aos endossomos e lisossomos. O vírus da *vaccinia* (poxvírus) pode penetrar por essa via, uma vez que os seus vírions são muito grandes para serem internalizados por endocitose mediada por clatrina. O vírus HIV também parece utilizar essa via para infectar macrófagos.

3.2.3.3 Translocação através da membrana plasmática

Esse é um mecanismo pouco conhecido, provavelmente raro entre os vírus animais e parece ocorrer somente com os vírus sem envelope.

3.2.3.4 Transferência direta entre células

Além dos mecanismos específicos de penetração, alguns vírus podem ser transmitidos diretamente entre células, sem a necessidade de egresso e infecção de uma nova célula. Essa transmissão é possível pela inserção de proteínas virais na membrana lateral da célula. As proteínas virais produzem fusão entre as células vizinhas e transferência do material genético do vírus para a nova célula. Esse mecanismo de transferência direta (observada nos paramixovírus e poxvírus, entre outros) permite ao vírus infectar novas células sem se expor ao sistema imunológico.

Como já mencionado, a simples internalização da partícula vírica não assegura que a replicação irá ocorrer. O desnudamento e a entrega do material genético aos locais apropriados são necessários para o prosseguimento do ciclo. Além disso, a célula deve apresentar as condições intracelulares necessárias para a expressão gênica e replicação do genoma. Sob ME, é freqüente a

visualização de vírions internalizados em células, porém localizados em sítios inapropriados para o prosseguimento da replicação. Alguns desses vírions podem ser eventualmente reciclados e liberados na superfície celular, podendo infectar produtivamente outras células. A maioria, porém, parece estar destinada à inativação por processos catabólicos celulares.

3.3 Etapas após a penetração

3.3.1 Desnudamento

O termo *desnudamento* (do inglês *uncoating*) refere-se à série de eventos que ocorrem imediatamente após a penetração, em que os componentes do nucleocapsídeo são parcial ou totalmente removidos, resultando na exposição parcial ou completa do genoma viral. A remoção das proteínas do nucleocapsídeo é necessária para a exposição do genoma às enzimas e fatores responsáveis pela transcrição (vírus DNA e RNA de cadeia negativa) ou tradução (vírus RNA de cadeia positiva). No ciclo replicativo de alguns vírus, a replicação do genoma ocorre após o desnudamento completo do genoma (poliovírus e flavivírus). Em outros vírus, a remoção parcial das proteínas do nucleocapsídeo já é suficiente para a ocorrência das etapas seguintes do ciclo (paramixovírus, rabdovírus, ortomixovírus e reovírus). Portanto, o desnudamento parece ter uma definição mais funcional do que estrutural. A estrutura e complexidade de cada nucleocapsídeo é que determina os passos subsequentes na replicação.

O produto do desnudamento depende da estrutura do nucleocapsídeo. Nos picornavírus, o resultado é a liberação do RNA genômico totalmente desnudo, com uma proteína de 23 aminoácidos (VPg) ligada covalentemente à sua extremidade 5'. Em alguns vírus (paramixovírus, rabdovírus, arenavírus e ortomixovírus), o genoma nunca é totalmente desnudo. Os processos de transcrição e replicação ocorrem com o genoma recoberto por proteínas (ribonucleoproteína). Nos reovírus e poxvírus, a transcrição e a replicação do genoma ocorrem no interior de capsídeos parcialmente desintegrados.

Nos vírus que penetram por fusão com a membrana plasmática, a remoção do envelope, que ocorre pela fusão faz parte do desnudamento. Em alguns vírus RNA de cadeia positiva (togavírus), a remoção das proteínas do nucleocapsídeo ocorre logo após a penetração, pela sua interação com o RNA dos ribossomos. Nos vírus pH dependentes, a acidificação dos endossomos desencadeia a fusão e também pode facilitar a dissociação das proteínas do genoma. Isso resulta na liberação do nucleocapsídeo ou do genoma desprovido de proteínas diretamente no citoplasma. Nos herpesvírus, adenovírus e papovavírus, o capsídeo permanece parcialmente íntegro após a penetração, sendo transportado até as proximidades do núcleo associado aos túbulos do citoesqueleto. O desnudamento e a penetração do nucleocapsídeo no núcleo ocorre próximo aos poros nucleares. Nos picornavírus, a acidificação dos endossomos provoca alterações conformacionais no capsídeo que proporcionam interações de suas proteínas com a membrana, resultando na formação de aberturas através das quais o genoma é liberado no citoplasma.

O desnudamento torna o genoma acessível às enzimas e a outros fatores celulares responsáveis pelas etapas subsequentes da replicação. Dependendo do tipo de genoma, as etapas que se seguem ao desnudamento diferem entre os vírus.

3.3.2 Movimentação intracelular

Após a penetração, o genoma viral precisa ser transportado até o local onde ocorrerão a expressão gênica e a replicação. A movimentação dos vírions no citoplasma ocorre inicialmente de forma passiva, no interior de vesículas endocíticas. Após a penetração, os nucleocapsídeos podem interagir com os componentes do citoesqueleto ou com proteínas transportadoras. Os paramixovírus (que penetram na célula por fusão direta do envelope com a membrana celular) e os picornavírus (que penetram através de poros na membrana endossomal) não necessitam de transporte intracelular antes de iniciar a síntese de proteínas, pois os ribossomos podem estar

próximos ao local de penetração. Outros vírus penetram na célula em vesículas endocíticas, que se movimentam entre a densa cadeia de microfilamentos e entregam a sua carga aos locais apropriados. Os herpesvírus e retrovírus penetram na célula por fusão do envelope com a membrana plasmática, e o genoma viral deve ser transportado até o núcleo para a replicação. Para iniciar a transcrição reversa de seu material genético, os retrovírus interagem com filamentos de actina, necessitam funções relacionadas à miosina e dos microtúbulos. O HSV ultrapassa o córtex celular (composto basicamente de actina) por mecanismos ainda desconhecidos, e os nucleocapsídeos são transportados até o núcleo associados com os microtúbulos. Os adenovírus e parvovírus também são transportados por microtúbulos até o núcleo da célula hospedeira.

3.3.3 Penetração nuclear

O núcleo é o local de replicação da maioria dos vírus DNA e também dos ortomixovírus. No entanto, a presença da membrana nuclear representa uma barreira adicional à progressão dos vírions ou dos nucleocapsídeos, pois os poros nucleares permitem a passagem somente de partículas com até 39 nm de diâmetro. Conseqüentemente, o transporte dos nucleocapsídeos ou do genoma até o interior do núcleo depende de interações específicas com componentes celulares. Vírions pequenos, como os parvovírus (18-24 nm) e os capsídeos do vírus da hepatite B (36 nm), podem ser transportados intactos (ou semi-integros), por meio de mecanismos citoplasmáticos especializados (microtúbulos, microfilamentos e proteínas motoras), e, posteriormente, translocados através dos poros nucleares por proteínas especializadas. Os vírions ou capsídeos maiores necessitam ser previamente desintegrados ou deformados para permitirem a introdução do genoma viral pelos poros nucleares. O nucleocapsídeo do HSV, por exemplo, é transportado do córtex celular até o núcleo ao longo dos microtúbulos e liga-se, na face citoplasmática da membrana nuclear, por meio de uma molécula denominada de importina. Posteriormente ocorre uma abertura parcial de um dos vértices do capsídeo e a liberação do

DNA viral através do poro nuclear. O adenovírus tipo 2 é transportado ao longo dos microtúbulos até as proximidades do núcleo e liga-se a filamentos dos poros nucleares. Após, com o auxílio das importinas, e pela ligação com histonas, ocorre a desmontagem do vírion e o DNA viral é translocado para o interior do núcleo.

3.4 Expressão gênica

A síntese de proteínas virais pela maquinaria celular é o evento central da multiplicação dos vírus. O genoma viral codifica diferentes proteínas que devem desempenhar pelo menos três funções básicas: a) assegurar a replicação do genoma; b) subverter funções celulares em seu benefício e c) empacotar os genomas recém-replicados em novas partículas víricas. Os vírus não possuem metabolismo próprio e são inteiramente dependentes da maquinaria celular para a produção de suas proteínas. Ou seja, as informações genéticas contidas no genoma dos vírus são decodificadas em proteínas virais pelo aparato de síntese protéica da célula hospedeira. Para utilizar esse aparato para a produção de suas proteínas, os vírus tiveram que evoluir de forma a satisfazer algumas restrições impostas pelas células hospedeiras. O ponto-chave desse processo é a síntese (ou apresentação) de mRNAs que sejam adequadamente reconhecidos e traduzidos pelos ribossomos. Dependendo da estrutura e organização genômica, os vírus de diferentes famílias convergem para a produção de mRNA por diferentes vias (Figura 5.4).

O aparato celular de transcrição (RNA polimerase II e fatores de transcrição) e de processamento dos transcritos se localiza no núcleo das células hospedeiras. A maioria dos vírus DNA replica no núcleo e, assim, pode utilizar esses mecanismos. Os genes desses vírus contêm regiões regulatórias (promotores, *enhancers*) que são reconhecidas pela RNA polimerase II (RNA-polII) e pelos fatores de transcrição celulares. Os transcritos (mRNA) produzidos contêm a estrutura *cap*, são poliadenilados e alguns são submetidos a *splicing* antes de serem exportados para o citoplasma. Embora sejam vírus DNA, os poxvírus e asfarvírus replicam no citoplasma e são independentes da maquinaria nuclear de síntese

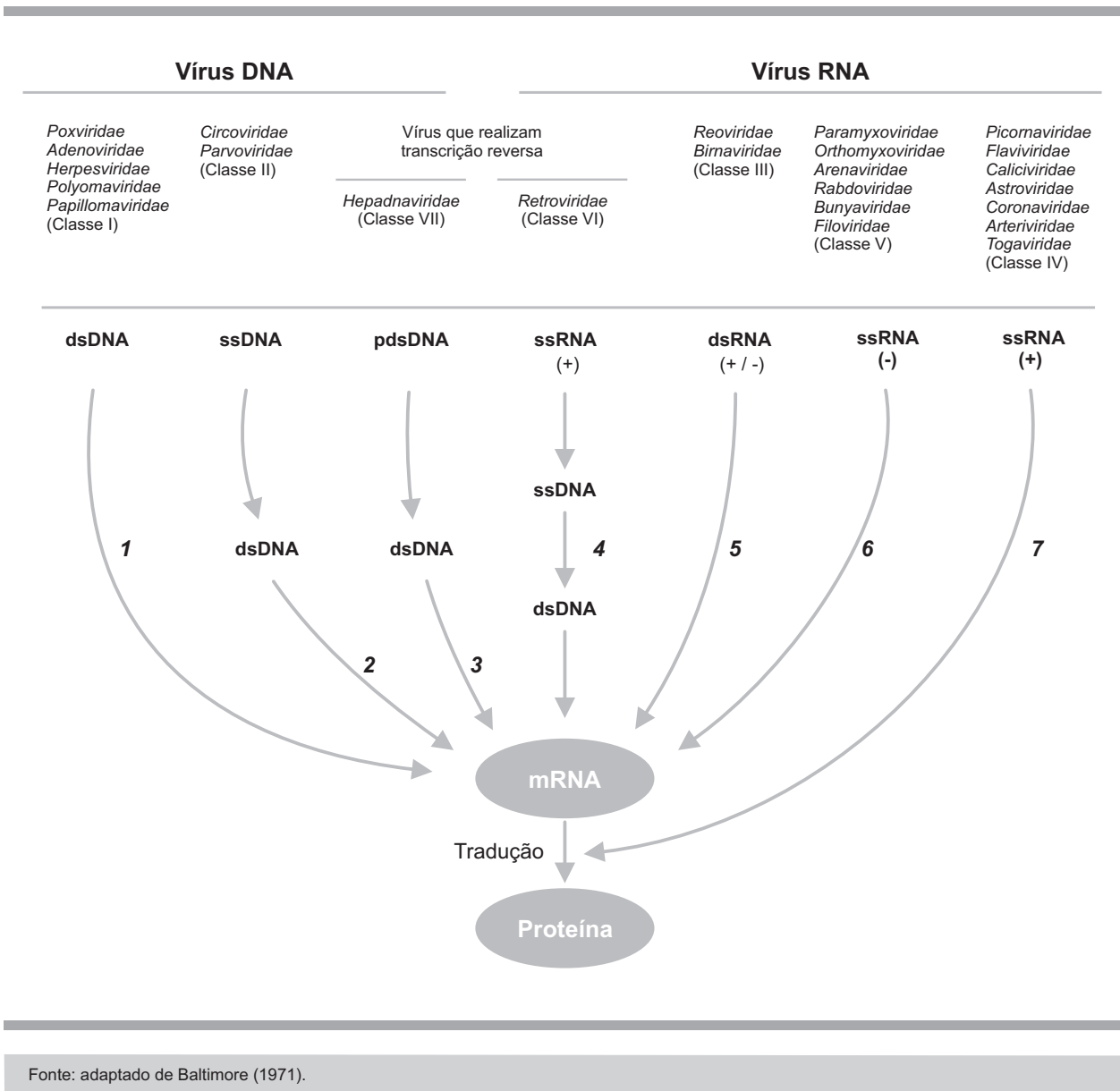


Figura 5.4. Estratégias de produção de RNA mensageiros (mRNA) e expressão gênica das diferentes classes de vírus. Nos vírus da classe I, os promotores virais são reconhecidos por fatores celulares, e os genes são transcritos pela RNAPolIII celular, resultando em mRNAs traduzíveis pelos ribossomos (1). Nos vírus da classe II, o genoma DNA de fita simples linear (parvovírus) ou circular (circovírus) é, inicialmente, convertido em fita dupla e transcrito pela RNAPolIII (2). Apenas as cadeias negativas dos vírus da classe III (genoma RNA de fita dupla) são transcritas pela polimerase viral, originando os mRNA (5). O genoma dos vírus da classe IV (RNA fita simples de polaridade positiva) pode ser diretamente traduzido, em toda a sua extensão (flavivírus, picornavírus) ou parcialmente (outros) (7). Nestes, o restante dos mRNA são produzidos pela transcrição do RNA intermediário pela polimerase viral. Nos vírus da classe V, o genoma RNA de polaridade negativa é transcrito pela polimerase presente nos vírions (6). Nos hepadnavírus (classe VII), os mRNA são produzidos pela transcrição do DNA viral pela RNAPolIII e fatores celulares (3). Nos retrovírus (classe VI), os mRNA são produzidos pela transcrição do provírus DNA (uma cópia do RNA genômico) pela RNAPolIII e fatores celulares, após a integração do provírus ao genoma celular (4).

e processamento de DNA e RNA. Isso só é possível porque esses vírus trazem, nos vírions, as enzimas e fatores auxiliares para a transcrição e processamento dos seus mRNA.

Os vírus RNA, com exceção dos retrovírus, não dependem da maquinaria celular de transcri-

ção e convergem para a produção de mRNA por vias diferentes. Os retrovírus utilizam a maquinaria celular para a transcrição dos seus genes, após a integração de uma cópia DNA do genoma (provírus) nos cromossomos celulares. A transcrição resulta na produção de mRNA para a síntese

protéica e também de cópias de RNA genômico que serão encapsidadas.

Os vírus RNA convergem para a apresentação de mRNA traduzíveis de duas formas: a) o próprio genoma dos vírus RNA de sentido positivo serve de mRNA e é parcial ou integralmente traduzido pelos ribossomos. Nos vírus cujo genoma é parcialmente traduzido, os mRNAs, para a síntese das proteínas estruturais, são produzidos pela transcrição do RNA de sentido antígenômico, que é produzido pela replicação do genoma; b) os vírus RNA de sentido negativo trazem a sua própria RNA polimerase nos vírions. Assim, no início da infecção, essa enzima se encarrega de transcrever o genoma viral, produzindo os mRNA para a síntese protéica. Nos vírus RNA de cadeia dupla, a RNA polimerase trazida nos vírions transcreve as cadeias genômicas negativas em mRNA.

A maquinaria de síntese protéica das células eucariotas (ribossomos e fatores auxiliares) se localiza no citoplasma; somente traduz mRNA monocistrônicos e que possuam a estrutura *cap* na extremidade 5'. Os mRNA dos vírus DNA que replicam no núcleo são produzidos, processados e exportados para o citoplasma pela maquinaria da célula e, como tal, assemelham-se aos mRNA celulares. Os mRNA do vírus DNA que replicam no citoplasma (poxvírus, asfarvírus) são produzidos e modificados no próprio citoplasma por enzimas virais, também à semelhança dos mRNA celulares. Para serem traduzidos diretamente, os genomas dos vírus RNA de sentido positivo possuem *cap* 5' (alguns flavivírus, coronavírus, arterivírus e togavírus) ou uma estrutura secundária que permite o reconhecimento pelos ribossomos e o início da tradução. Essa estrutura é denominada IRES (*internal ribosomal entry site*) e está presente próxima à extremidade 5' do genoma dos picornavírus e de alguns membros da família *Flaviviridae* (pestivírus). Nos vírus RNA de sentido negativo e RNA de cadeia dupla, a RNA polimerase viral produz mRNAs com *cap* e cauda poliA.

A maquinaria de tradução das células eucariotas não é capaz de traduzir mRNAs policistrônicos, ou seja, mRNAs que contenham mais de uma ORF. A tradução de ORFs internas no

mRNA exige o reconhecimento de sequências específicas localizadas próximas ao códon de iniciação, mecanismo ainda não identificado em eucariotas. Por isso, os vírus desenvolveram diferentes estratégias de codificação de suas proteínas: produção de mRNA monocistrônicos (contendo uma ORF = um gene) ou produção de mRNA policistrônicos. Os mRNAs policistrônicos contêm uma única e longa ORF que codifica uma longa poliproteína. À medida que vai sendo traduzida, essa poliproteína é clivada por proteases celulares e/ou virais, dando origem às proteínas virais individuais. Do ponto de vista da tradução, os mRNA que contêm uma única ORF, que é traduzida em poliproteína, comportam-se como mRNAs monocistrônicos, pois a tradução se inicia no primeiro códon de iniciação e termina no códon de terminação. As proteínas individuais são geradas após este processo, pela clivagem enzimática.

Além de superar essas restrições, os vírus tiveram que desenvolver estratégias que os permitam utilizar a maquinaria celular de tradução em seu benefício. Isso porque os mRNA celulares estão presentes em muito maior quantidade e competem com grande vantagem em relação aos mRNA virais. Dentre as estratégias virais utilizadas pelos vírus para competir pelo aparato celular de tradução destacam-se: a) inibição da transcrição celular (vírus da estomatite vesicular, VSV); b) inibição do processamento e/ou maturação e exportação de mRNA celulares do núcleo (adenovírus, HIV); c) degradação de mRNA celulares no núcleo (ortomixovírus, HSV) ou no citoplasma (buniavírus); d) inibição seletiva da tradução de mRNA celulares (poliovírus, FMDV); e) facilitação do processamento, transporte e tradução de mRNA virais (HIV); g) alteração da especificidade de reconhecimento de mRNA para a tradução: a tradução de mRNA que possuem *cap* é inibida e as células infectadas passam a traduzir mRNA virais, que são reconhecidos pelos ribossomos através da estrutura IRES (picornavírus).

3.5 Replicação do genoma

Dependendo do tipo e organização genômica, os vírus podem utilizar diferentes estratégias

para cumprir as etapas de expressão gênica e replicação do seu genoma. Baltimore (1971) propôs a classificação dos vírus em seis grupos, de acordo com o tipo de genoma, local e estratégia de replicação. Essa classificação foi posteriormente ampliada para contemplar novos vírus e estratégias identificadas, resultando em sete grupos ou classes (Tabela 5.2). A seguir serão abordados os principais aspectos da replicação de cada um desses grupos. Os detalhes da replicação dos vírus de cada família serão abordados nos capítulos específicos.

3.5.1 Replicação dos vírus DNA

A replicação dos vírus DNA é realizada pela ação orquestrada da maquinaria da célula hospedeira associada com fatores codificados pelo ví-

rus. A contribuição dos fatores virais na replicação desses vírus, no entanto, varia muito entre as diferentes famílias. Em geral, os vírus DNA mais simples (circovírus, parvovírus e poliomavírus) utilizam extensivamente a maquinaria celular, pois os seus genomas codificam poucos produtos associados com funções replicativas. Por outro lado, os vírus DNA complexos (herpesvírus e poxvírus) codificam muitas enzimas e fatores envolvidos na replicação. Esses últimos seriam, teoricamente, menos dependentes da maquinaria celular para a replicação de seus genomas e a conseqüente produção da progênie viral.

A replicação da maioria dos vírus DNA ocorre no núcleo da célula hospedeira. O genoma desses vírus contém regiões regulatórias que são reconhecidas pela maquinaria celular de transcrição e, assim, podem utilizá-la para a produção

Tabela 5.2 Classificação dos vírus de acordo com o tipo de genoma, local de replicação e estratégia utilizada para produzir os mRNAs.

Classe	Genoma	Local de replicação	Famílias
I	DNA de cadeia dupla	Ia. Núcleo	<i>Polyomaviridae</i> <i>Papillomaviridae</i> <i>Adenoviridae</i> <i>Herpesviridae</i>
		Ib. Citoplasma	<i>Poxviridae</i> <i>Asfarviridae</i>
II	DNA cadeia simples	Núcleo	<i>Parvoviridae</i> <i>Circoviridae</i>
III	RNA de cadeia dupla	Citoplasma	<i>Reoviridae</i> <i>Birnaviridae</i>
IV	RNA de cadeia simples, sentido positivo	IVa. Tradução integral do genoma	<i>Flaviviridae</i> <i>Picornaviridae</i>
		IVb. Tradução parcial do genoma; mRNAs subgenômicos	<i>Astroviridae</i> <i>Caliciviridae</i> <i>Togaviridae</i> <i>Coronaviridae</i> <i>Arteriviridae</i>
V	RNA de cadeia simples, sentido negativo	Va. Núcleo	<i>Orthomyxoviridae</i> <i>Bornaviridae</i>
		Vb. Citoplasma	<i>Bunyaviridae</i> <i>Arenaviridae</i> <i>Rabdoviridae</i> <i>Paramyxoviridae</i> <i>Filoviridae</i>
VI	RNA de cadeia simples e intermediário DNA	Citoplasma/núcleo	<i>Retroviridae</i>
VII	DNA de cadeia parcialmente dupla e intermediário RNA	Núcleo/citoplasma	<i>Hepadnaviridae</i>

Fonte: adaptado de Baltimore (1971).

dos mRNA necessários à síntese de suas proteínas. Em diferentes graus, esses vírus também utilizam enzimas e fatores celulares para o metabolismo de nucleotídeos, para a síntese de DNA e replicação do genoma.

Os poxvírus e asfarvírus se constituem em exceções, pois trazem, nos vírions, as enzimas e fatores necessários para a transcrição e modificação dos mRNA e codificam as enzimas e fatores requeridos para a replicação do genoma. Mesmo assim, são dependentes da maquinaria celular de síntese protéica. A replicação desses vírus ocorre inteiramente no citoplasma.

O mecanismo de replicação do genoma também apresenta diferenças entre as famílias, devido a peculiaridades de estrutura, topologia e organização genômica. A replicação do genoma circular de fita dupla dos poliomavírus, por exemplo, é realizada quase que exclusivamente por enzimas e fatores celulares. A síntese das novas cadeias utiliza um *primer* de RNA e ocorre de forma bidirecional e semidescontínua, a exemplo da replicação do DNA celular. A replicação dos genomas DNA de fita simples (circovírus e parvovírus) também envolve a participação predomi-

nante de fatores celulares e se inicia com a síntese da fita complementar. Nos parvovírus, a própria extremidade 3' do genoma serve de *primer* para o início da replicação. A replicação do genoma linear de fita dupla dos adenovírus se inicia com um *primer* de proteína, ocorre de forma contínua e em duas etapas. Apenas uma das cadeias é replicada em cada etapa. A replicação do genoma dos herpesvírus e poxvírus é mais complexa e envolve a participação de vários fatores codificados pelo genoma viral. Os herpesvírus parecem replicar o seu genoma por um mecanismo de círculo rolante, no qual a replicação inicia-se após a circularização do genoma e resulta na produção de multímeros, que são posteriormente clivados em unidades genômicas. A replicação do genoma dos hepadnavírus inclui uma etapa de transcrição reversa, na qual um RNA produzido a partir do DNA genômico é convertido em DNA de fita simples e, posteriormente, em DNA de fita dupla.

As etapas do ciclo replicativo dos diferentes grupos de vírus DNA estão ilustradas esquematicamente nas Figuras 5.5 a 5.8 (a forma de apresentação das etapas de replicação foi adaptada de ROIZMAN e PALESE, 1996).

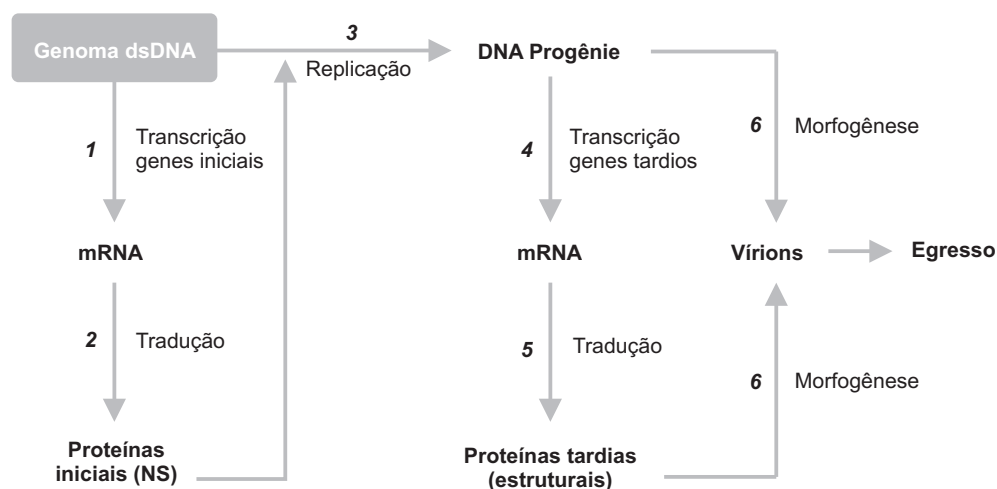


Figura 5.5. Ciclo replicativo dos vírus da classe Ia (*Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae*). Os genes iniciais são transcritos antes da replicação do genoma (1) e geralmente codificam proteínas não-estruturais (NS) envolvidas nas etapas seguintes da replicação (2). Essas proteínas, isoladamente ou em conjunto com fatores celulares, atuam na replicação do genoma (3). Os genes tardios são transcritos após a replicação do genoma (4) e codificam proteínas estruturais em sua maioria (5). As proteínas estruturais são importadas para o núcleo, onde ocorre a morfogênese (6).

3.5.1.1 Vírus da classe Ia

Os genes desses vírus são transcritos pela maquinaria celular de transcrição, pois possuem as regiões regulatórias (promotores, *enhancers*), que são reconhecidas pela RNAPolII e pelos fatores de transcrição da célula hospedeira. Os genes são classificados em duas ou mais classes e são transcritos sequencialmente sob regulação temporal restrita. Os genes iniciais (*immediate-early* e *early* nos herpesvírus; *early* nas demais famílias) são transcritos logo após a penetração na célula e, geralmente, codificam proteínas não-estruturais que possuem funções regulatórias sobre outros genes e também enzimas e fatores envolvidos na replicação do genoma. A replicação do genoma dos poliomavírus e papilomavírus é realizada quase que exclusivamente por fatores e enzimas celulares; já os herpesvírus e adenovírus codificam várias proteínas com funções replicativas (DNA polimerase, proteína de ligação no DNA, helicase e quinases de nucleotídeos). Os genes tardios são transcritos após a replicação do genoma e codificam principalmente proteínas estruturais e/ou proteínas envolvidas na morfogênese. Algumas proteínas não-estruturais (NS), que são necessárias nos estágios iniciais do próximo ciclo

de infecção, também são produzidas nessa etapa e incorporadas na progênie viral (Figura 5.5).

3.5.1.2 Vírus da classe Ib

Os poxvírus e asfarvírus realizam o seu ciclo replicativo inteiramente no citoplasma. Para isso, trazem, nos vírions, as enzimas e fatores necessários para a transcrição dos seus genes e processamento dos transcritos. O genoma desses vírus codifica vários produtos que atuam no metabolismo de nucleotídeos e na replicação do genoma (DNA polimerase, helicase, proteína de ligação no DNA e quinase de timidina), que, portanto, é realizada predominantemente por enzimas e fatores virais. A expressão gênica ocorre em três etapas principais: inicial, intermediária e tardia. Os genes iniciais são os primeiros a ser expressos, e os seus produtos possuem funções diversas, incluindo a conclusão do desnudamento, a replicação do genoma e ativação da transcrição dos genes intermediários. As proteínas intermediárias atuam principalmente na ativação da transcrição dos genes tardios, cujos produtos são predominantemente proteínas estruturais e/ou que participam da morfogênese da progênie viral (Figura 5.6). Esses vírus codificam vários produ-

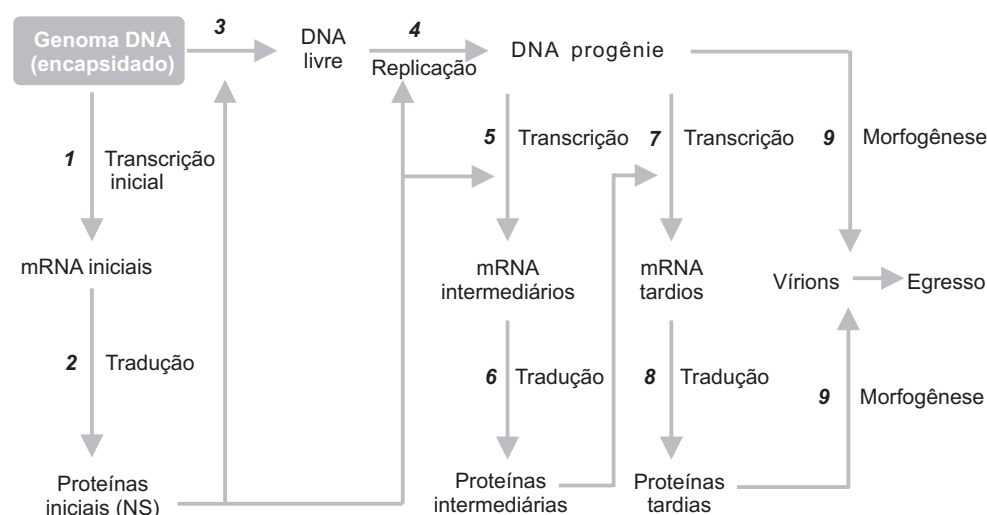


Figura 5.6. Ciclo replicativo dos vírus da classe Ib (*Poxviridae* e *Asfarviridae*). Os genes iniciais são transcritos pela RNA polimerase viral ainda com o DNA parcialmente encapsidado, resultando nos mRNAs (1) que são traduzidos nas proteínas iniciais (2). Essas proteínas participam do desnudamento completo do genoma (3), na sua replicação (4) e na transcrição (5) dos genes que codificam as proteínas intermediárias (6). Estas proteínas estão envolvidas na transcrição dos genes tardios (7), que codificam principalmente proteínas estruturais (8). Estas proteínas participam da morfogênese dos vírions, juntamente com o DNA recém-replicado (9).

tos que interferem com a resposta do hospedeiro à infecção, dificultando o reconhecimento das células infectadas pelo sistema imunológico do hospedeiro.

3.5.1.3 Vírus da classe II

A replicação do genoma dos parvovírus e circovírus é realizada predominantemente por enzimas e fatores da célula hospedeira. A primeira etapa da replicação é a síntese da cadeia complementar de DNA. O DNA de fita dupla (linear nos parvovírus, circular nos circovírus) é, então, transcrito pela RNA polII celular, originando os mRNAs para a síntese de proteínas virais. A replicação dos parvovírus está intimamente associada com a fase S do ciclo celular, demonstrando a dependência de fatores celulares presentes nesta fase. O genoma dos parvovírus é replicado de forma contínua, a partir de uma 3'-OH localizada na extremidade do *hairpin*, formado pelo pareamento das regiões complementares terminais. A síntese da nova cadeia é seguida pelo deslocamento da cadeia original, originando concatêmeros, que serão posteriormente clivados para originar os monômeros de extensão genômica.

Os parvovírus encapsidam predominantemente cópias de DNA de sentido negativo (aquelas que serão transcritas), mas algumas espécies podem encapsidar também cópias positivas e, ocasionalmente, uma mistura das duas (Figura 5.7).

3.5.1.4 Vírus da classe VII

A replicação do genoma dos hepadnavírus envolve uma etapa de transcrição reversa e ocorre parte no núcleo e parte no citoplasma. No núcleo, o genoma de cadeia dupla parcial é convertido em um círculo covalentemente fechado (ccc) por fatores celulares e virais e, subsequentemente, transcrito pela RNAPolII celular. Além dos mRNA para a produção das proteínas virais, a transcrição produz RNAs com a extensão do genoma (pgRNA). Esses pgRNAs servirão de molde para a transcrição reversa, que é realizada pela polimerase viral, e ocorre no interior de capsídeos pré-formados no citoplasma. A síntese da cadeia complementar de DNA inicia em seguida, mas é interrompida por ocasião do egresso dos vírions. Com isso, as partículas víricas contêm uma molécula de DNA de fita parcialmente dupla (Figura 5.8).

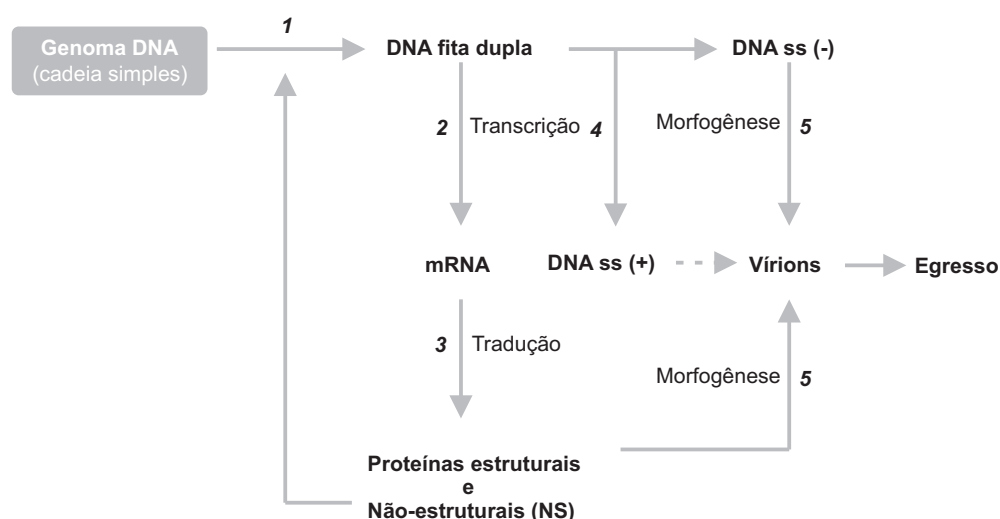


Figura 5.7. Ciclo replicativo dos vírus da classe II (*Parvoviridae* e *Circoviridae*). O genoma DNA de cadeia simples é, inicialmente, convertido em DNA de cadeia dupla por polimerases e fatores auxiliares da célula hospedeira (1). Apenas uma das cadeias (DNA de sentido negativo) é transcrita pela RNA polimerase II celular, originando os mRNAs (2), que são processados e exportados para o citoplasma, onde são traduzidos (3). A replicação do genoma depende da interação entre fatores celulares e virais e resulta na síntese de cópias de DNA de cadeia simples de sentido positivo (4) e negativo (5). As moléculas de DNA recém-replicadas são então incluídas nos vírions, através de interações específicas com as proteínas do capsídeo (6).

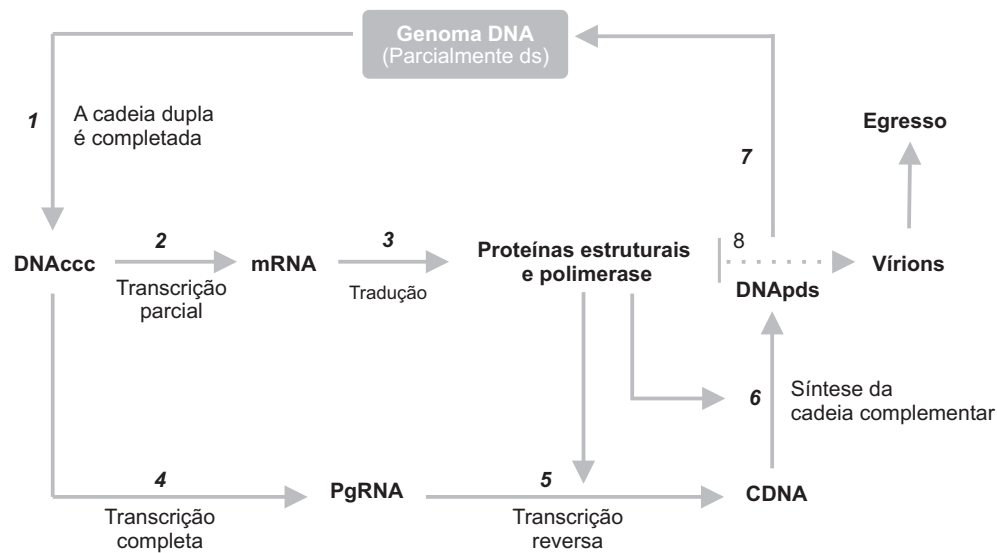


Figura 5.8. Ciclo replicativo dos vírus da classe VII (*Hepadnaviridae*). O DNA genômico é, inicialmente, convertido em uma molécula circular de cadeia dupla completa ccc (1). Essa molécula é transcrita pela RNA pol II celular, originando inicialmente mRNAs (2), que são processados e exportados para o citoplasma, onde serão traduzidos em proteínas estruturais e não-estruturais (3). RNAs com a extensão integral do genoma (pgRNA) são, então, produzidos (4) e exportados para o citoplasma. A polimerase viral recém-produzida realiza a transcrição reversa do pgRNAs, resultando em cDNA (5), que é convertido em DNA de cadeia dupla (6). Capsídeos contendo o DNA de cadeia parcialmente dupla podem voltar ao núcleo e reiniciar o ciclo (7) ou participar da morfogênese das partículas víricas (8).

3.5.2 Replicação dos vírus RNA

A replicação dos vírus RNA enfrenta algumas dificuldades adicionais, impostas por peculiaridades dos processos biossintéticos das células hospedeiras. A replicação do genoma desses vírus envolve a síntese de moléculas de RNA de sentido antígenômico, que servem de molde para a subsequente síntese de RNAs de sentido genômico. Essas reações são realizadas por polimerases específicas, que produzem moléculas de RNA a partir de moldes RNA (polimerases de RNA dependentes de RNA). No entanto, as células eucariotas não possuem tais enzimas e, por isso, não são capazes de replicar o genoma desses vírus. Assim, para replicar o genoma, os vírus RNA devem codificar as suas próprias enzimas replicativas. As polimerases de RNA virais, cuja função é produzir cópias do genoma, são denominadas genericamente *transcriptases* ou *replicases*.

Os vírus RNA de polaridade positiva solucionaram esse problema pela própria natureza do genoma: a enzima replicase é codificada pelo genoma e é produzida pela tradução direta do

genoma logo no início da infecção. Uma vez produzida, essa enzima se encarrega de replicar o genoma, produzindo cópias de RNA de sentido antígenômico, que servem de molde para a síntese de mais cópias de sentido genômico. Por isso, o genoma desses vírus é dito *infeccioso*, ou seja, a sua introdução por métodos artificiais em células permissivas (transfecção) resulta na ocorrência de todas as etapas do ciclo replicativo e na produção de progênie viral.

Por outro lado, o genoma dos vírus RNA de polaridade negativa não pode ser traduzido, pois possui o sentido complementar ao mRNA. Esses vírus solucionaram esse problema de forma diferente: trazem associado ao material genético algumas moléculas da polimerase de RNA (replicase). Uma vez no interior da célula, a replicase sintetiza cópias de RNA de sentido antígenômico que servem de mRNA para a síntese das proteínas virais. Esses RNAs também servem de molde para a síntese de mais cópias de RNA de sentido genômico. O genoma dos vírus RNA de polaridade negativa não é infeccioso, ou seja, a sua introdução (desprovido de proteínas) em células permissivas não resulta na ocorrência das etapas

seguintes da replicação. Em resumo, a necessidade da polimerase de RNA para replicar o genoma foi suprida, de formas diferentes, tanto pelos vírus RNA de sentido positivo como pelos vírus RNA de sentido negativo.

A replicação do genoma dos vírus RNA ocorre em duas etapas. A primeira etapa envolve a síntese de um RNA de sentido antígenômico, também denominado replicativo intermediário (RI). Nos vírus RNA de polaridade positiva, o RI possui polaridade negativa; nos vírus RNA de polaridade negativa, o RI possui polaridade positiva. A segunda etapa envolve a síntese de RNA de sentido genômico, utilizando o RI como molde. Em alguns vírus RNA de sentido positivo (Classe IVb), o RI também serve de molde para a síntese de mRNAs. Embora essas duas etapas façam parte do processo replicativo, às vezes, recebem denominações diferentes: a síntese de RNAs de polaridade positiva é denominada *transcrição*; a síntese da cópia negativa de RNA é denominada *replicação*. Essas duas etapas são realizadas pelas replicases virais, pois as células eucariotas não possuem enzimas e funções para replicar o RNA. Além das replicases, esses vírus codificam outras proteínas não-estruturais (NS) com funções diversas e que auxiliam, de algum modo, na replicação do genoma. Atividades de helicase, protease, ligação no RNA, ATPase, ribonuclease,

entre outras, já foram identificadas entre as proteínas NS dos vírus RNA.

Como os vírus RNA independem da maquinaria nuclear para a síntese e modificação de ácidos nucleicos, o seu ciclo replicativo pode ocorrer inteiramente no citoplasma. Os ortomixovírus constituem as exceções, pois dependem de segmentos dos mRNA celulares para a produção e funcionalidade de seus mRNAs e, por isso, replicam no núcleo da célula hospedeira.

Os retrovírus apresentam um mecanismo de replicação que difere dos demais vírus RNA. Embora possua polaridade positiva, o RNA genômico não é traduzido pelos ribossomos, e sim convertido em uma molécula de DNA de fita dupla pela enzima transcriptase reversa (RT) presente nos vírions. Essa molécula de DNA, denominada provírus, é integrada ao genoma da célula hospedeira e, posteriormente, transcrita pela RNAPo-III. A transcrição resulta em mRNAs para a síntese de proteínas estruturais e da enzima RT, e em cópias do RNA genômico, que é então incluído nas novas partículas víricas.

As etapas do ciclo replicativo dos diferentes grupos de vírus RNA estão ilustradas esquematicamente nas Figuras 5.9 a 5.13 (a forma de apresentação das etapas de replicação foi adaptada de ROIZMAN E PALESE, 1996).

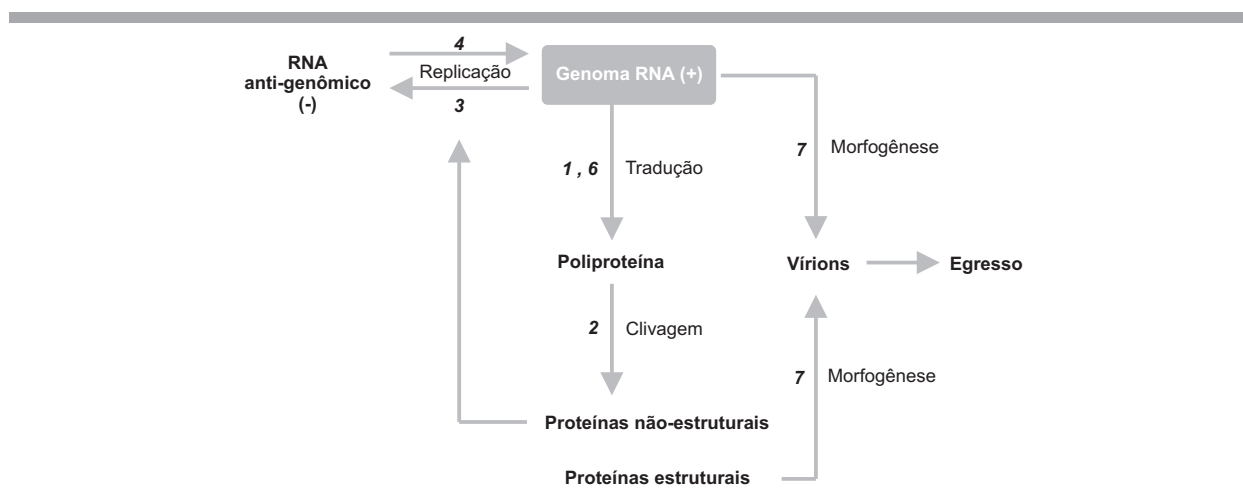


Figura 5.9. Ciclo replicativo dos vírus da classe IVa (*Picornaviridae* e *Flaviviridae*). A ORF única do genoma é traduzida em toda a sua extensão logo após o desnudamento, resultando da produção de uma longa poliproteína (1). À medida que vai sendo produzida, essa poliproteína vai sendo clivada por proteases celulares e/ou virais dando origem às proteínas individuais, entre as quais a RNA polimerase viral (2). A RNA polimerase é responsável pela replicação do genoma, que ocorre via produção de um intermediário RNA de sentido negativo (3, 4). As novas cópias de RNA de sentido positivo são, então, utilizadas em novos ciclos de tradução (6), replicação (3, 4) e/ou participam da morfogênese da progênie viral (7).

3.5.2.1 Vírus da classe IVa

O genoma desses vírus contém uma ORF única e longa, flanqueada por duas regiões não traduzidas (5'UTR; 3'UTR). Os genes das proteínas estruturais ocupam o terço 5' do genoma; o restante da ORF contém os genes das proteínas não-estruturais (NS). Essa ORF é traduzida em toda a sua extensão logo após o desnudamento, originando uma poliproteína longa, que é clivada em proteínas individuais à medida que vai sendo produzida (Figura 5.9). As proteínas NS recém-produzidas – incluindo a replicase viral – realizam a replicação do genoma, que envolve a síntese de um RNA de sentido antígenômico (de polaridade negativa); que serve, então, de molde para a síntese de cópias de RNA de sentido genômico. As regiões 5'UTR e 3'UTR do genoma contêm seqüências importantes para a transcrição e replicação. O genoma dos vírus do gênero *Flavivirus* possui a estrutura *cap* na extremidade 3'; os demais membros da família *Flaviviridae* e os picornavírus possuem estruturas secundárias (*internal ribosomal entry site*, IRES) na região 5'UTR, que são reconhecidas pelos ribossomos para o início da tradução.

3.5.2.2 Vírus da classe IVb

O genoma desses vírus é constituído por uma molécula de RNA de polaridade positiva,

mas a organização genômica e a estratégia de expressão gênica diferem do grupo anterior. Os genes que codificam as proteínas NS ocupam os dois terços iniciais do genoma; o terço restante contém os genes das proteínas estruturais. No início da infecção, o RNA genômico é traduzido parcialmente, resultando na produção de uma poliproteína que abrange a região das proteínas NS. A clivagem dessa poliproteína resulta nas proteínas NS, incluindo a replicase viral. Utilizando o RNA genômico como molde, a replicase sintetiza uma cópia de RNA de sentido antígenômico (polaridade negativa) com a extensão completa do genoma. Esse RNA antígenômico serve de molde para a síntese de vários mRNAs de extensões variáveis (denominados mRNAs subgenômicos), que serão traduzidos nas proteínas estruturais. O RNA antígenômico também serve de molde para a transcrição completa e produção de RNAs de sentido e extensão genômica. Resumindo, embora o genoma desses vírus possua polaridade positiva, apenas a região da ORF, que corresponde às proteínas NS, é traduzida pelos ribossomos. As proteínas estruturais são produzidas pela tradução de mRNAs subgenômicos, que, por sua vez, são produzidos pela transcrição do RNA antígenômico. Uma característica marcante dessas famílias – e que difere do grupo anterior – é a produção de mRNAs subgenômicos (Figura 5.10).

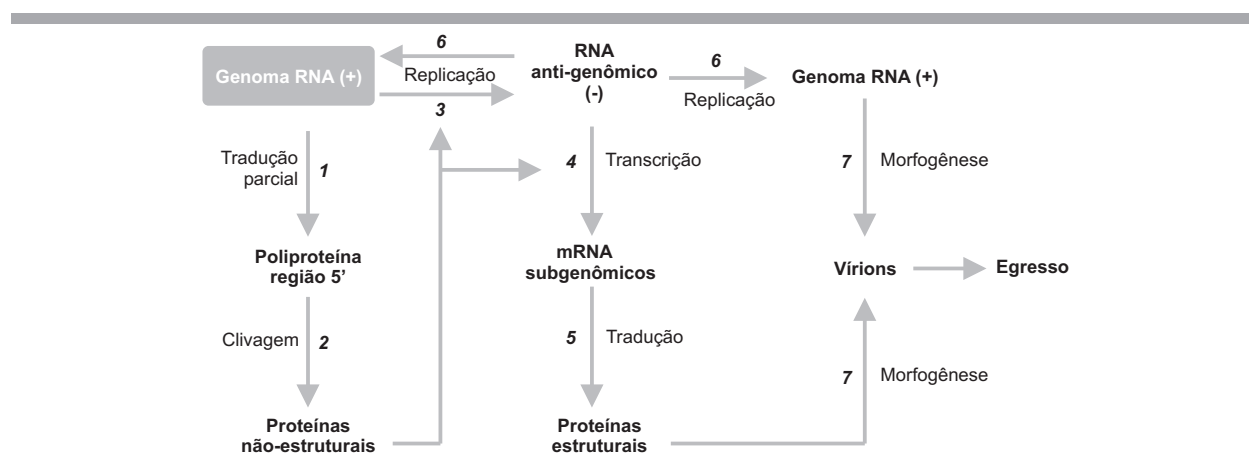


Figura 5.10. Ciclo replicativo dos vírus da classe IVb (*Coronaviridae*, *Togaviridae*, *Arteriviridae*, *Caliciviridae* e *Astroviridae*). O RNA genômico de sentido positivo é traduzido parcialmente, resultando em uma poliproteína (1) que é clivada em proteínas não-estruturais, incluindo a replicase (2). A replicase recém-produzida replica o genoma em toda a sua extensão, produzindo uma molécula de RNA de sentido antígenômico (3). O RNA anti-genômico serve de molde para a transcrição e produção de vários RNAm subgenômicos de extensões variáveis (4), cuja tradução resulta nas proteínas estruturais (5). Posteriormente também são produzidas cópias inteiras do genoma RNA de sentido positivo (6), que servirão de molde para ciclos adicionais de replicação (3) e serão oportunamente encapsuladas (7).

3.5.2.3 Vírus da classe V

Esses vírus possuem um genoma RNA de sentido negativo, não-segmentado (paramixovírus, rabdovírus e filovírus) ou segmentado (ortomixovírus, bunivírus e arenavírus) e trazem a replicase viral nos vírions. Nos vírus com o genoma não-segmentado, os genes são transcritos individualmente, originando mRNAs que são traduzidos nas proteínas estruturais e NS (Figura 5.11). Nos vírus com o genoma segmentado, cada segmento contém um (ou dois) gene(s), que também são transcritos individualmente. Nas etapas iniciais da infecção, a transcrição é direcionada para a síntese de mRNAs para a produção de proteínas virais. Em fases tardias do ciclo, o modo de transcrição deve ser alterado, de modo a produzir os RNAs intermediários de replicação (RI) de sentido antígenômico. Nos vírus com o genoma não-segmentado, esses RI possuem a extensão inteira do genoma e servem de molde para a síntese de moléculas de RNA de sentido genômico. Dois tipos de RNAs de sentido positivo são, então, produzidos: os mRNA com a extensão dos genes individuais (para a tradução); e o RNA RI, com a extensão inteira do genoma (para a replicação).

Nos vírus com o genoma segmentado, a transcrição dos segmentos genômicos de RNA também resulta em dois tipos de RNAs, com funções diferentes (mRNAs para a tradução; RI RNAs para a replicação). Os mRNAs e RIs, derivados de cada segmento, no entanto, possuem tamanhos aproximados. Os mRNAs possuem alguns nucleotídeos a mais e a estrutura *cap* na extremidade 5' e uma cauda poliA na extremidade 3'. Os RNAs RI, sem *cap* ou poliA são produzidos tardiamente na infecção e servem exclusivamente de molde para a replicação e produção de segmentos de RNA genômicos. Todas as etapas de transcrição e replicação desses vírus ocorrem com o genoma intimamente associado com proteínas, principalmente a nucleoproteína (NP), formando o complexo ribonucleoproteína (RNP).

Os arenavírus e os vírus do gênero *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) apresentam uma estratégia peculiar de expressão de alguns de seus genes. Os RNA genômicos possuem polaridade negativa e a maioria dos genes é expressa pela estratégia descrita acima. No entanto, um dos segmentos genômicos contém sequências codificantes de proteína tanto no sentido do genoma (sentido negativo) como no sentido antígenômico. Essa es-

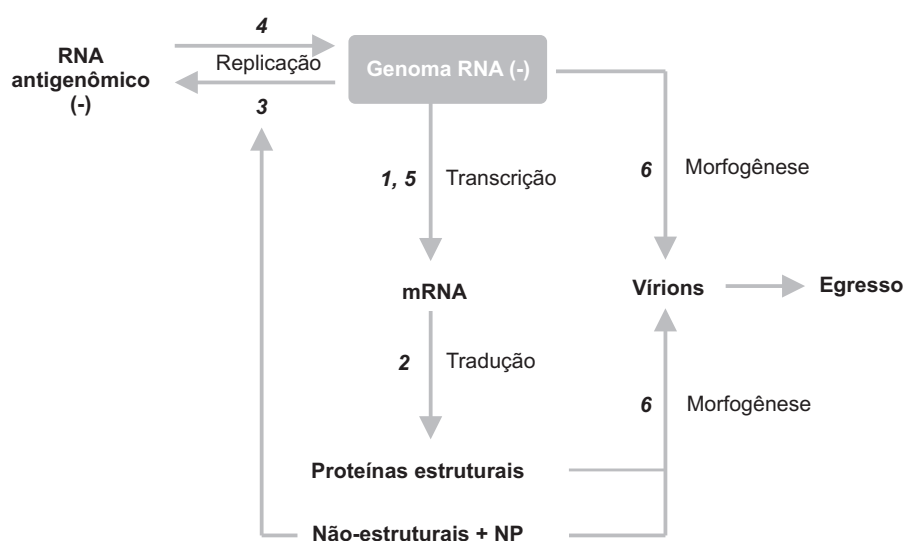


Figura 5.11. Ciclo replicativo dos vírus da classe V (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Bunyaviridae*). Os genes individuais são transcritos pela RNA polimerase presente nos vírions, produzindo mRNAs correspondentes a cada gene (1). A tradução desses mRNA resulta em proteínas estruturais e NS (2). As proteínas NS, incluindo a replicase, participam da replicação do genoma. A replicação ocorre via síntese de RNAs de sentido antígenômico (3), que servem de molde para a síntese de RNAs de sentido genômico (4). As moléculas de RNA de sentido genômico servem de molde para novos ciclos de transcrição (5), replicação (3, 4) e serão posteriormente encapsidadas (6).

estratégia é denominada *ambissense* e é única dessas famílias.

3.5.2.4 Vírus da classe III

O genoma desses vírus é composto por 10 a 12 segmentos (reovírus) ou dois segmentos (birnavírus de animais) de RNA de fita dupla. Nos reovírus, a maioria dos segmentos codifica apenas uma proteína; poucos segmentos contêm dois genes. Logo após a penetração e ainda em capsídeos semi-integros, a polimerase viral presente nos vírions realiza a *transcrição primária* de cada segmento. Os mRNA resultantes possuem duas funções: são traduzidos em proteínas e, já associados com as proteínas estruturais recém-produzidas, servem de molde para a *replicação* (síntese de RNAs de sentido negativo). Dentro de capsídeos pré-formados, os segmentos de RNA de polaridade negativa recém-produzidos são transcritos (*transcrição secundária*). Os transcritos resultantes são utilizados predominantemente para a produção de proteínas nas fases tardias do ciclo. Os eventos que ocorrem nas fases finais do ciclo não estão esclarecidos, mas parecem envolver a associação das proteínas externas do capsí-

deo com os complexos pré-formados entre o genoma e outras proteínas estruturais. A liberação dos vírions maduros ocorre de forma ineficiente após a lise celular. As moléculas de RNA genômico possuem funções distintas: as moléculas de RNA de polaridade negativa servem apenas de molde para a transcrição. A função aparente das moléculas genômicas de RNA positivo é apenas parear com as cadeias negativas. Já as moléculas de RNAs de sentido positivo, produzidas durante a infecção, possuem duas funções: podem ser traduzidas em proteínas (mRNAs) e/ou servem de molde para a síntese das cadeias negativas (Figura 5.12).

3.5.2.5 Vírus da classe VI

A replicação do genoma dos retrovírus inclui etapas que ocorrem no citoplasma (logo após a penetração do nucleocapsídeo na célula hospedeira) e no núcleo (após a integração do material genético viral no genoma da célula). O genoma desses vírus é composto por duas moléculas idênticas de RNA de sentido positivo que, no entanto, não são traduzidas pelos ribossomos. No início da infecção, a molécula de RNA genômico é con-

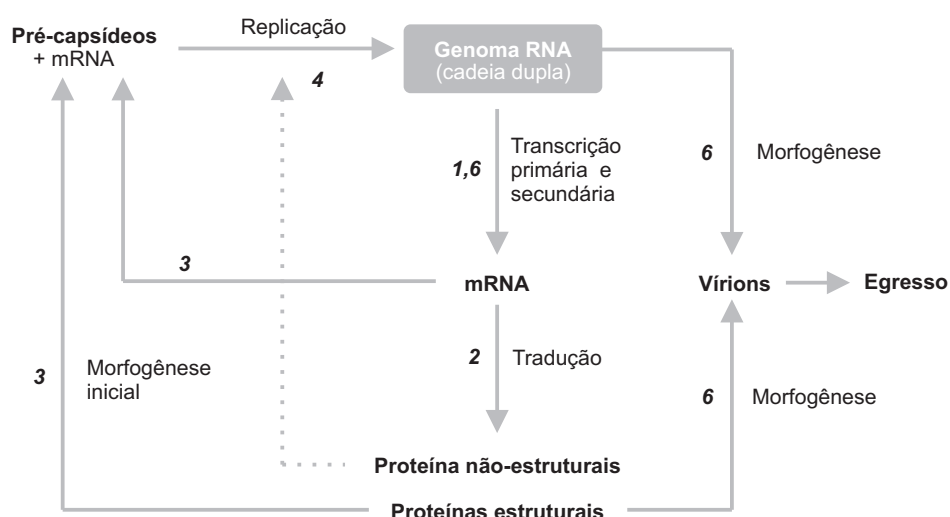


Figura 5.12. Ciclo replicativo dos vírus da classe III (*Reoviridae* e *Birnaviridae*). A replicase viral trazida nos vírions realiza a transcrição primária, produzindo mRNAs (1), que são traduzidos em proteínas estruturais e não-estruturais (2). Esses mRNAs formam complexos com as proteínas estruturais recém-produzidas (3) e, no interior desses complexos, servem de molde para a síntese de RNAs de sentido negativo, com a participação das proteínas NS (4). As moléculas de RNA de cadeia dupla, resultantes da replicação (4), servem de molde para a transcrição secundária (5) e para etapas adicionais de replicação (4). Essas moléculas, já conjugadas com algumas proteínas estruturais, eventualmente participam da morfogênese pela associação com as demais proteínas do capsídeo (6).

vertida em uma molécula de cDNA pela enzima viral transcriptase reversa (RT, DNA polimerase dependente de RNA), que, em seguida, é convertida em uma molécula de DNA de fita dupla. Essa molécula, denominada *provírus*, ingressa no núcleo e é integrada no genoma da célula hospedeira, pela atividade *integrase* da polimerase viral. A integração do provírus no genoma celular assegura a perpetuação das informações genéticas do vírus no hospedeiro, e é absolutamente necessária para a continuação do ciclo replicativo. A próxima etapa é a transcrição dos genes virais pela RNAPolIII e fatores de transcrição celulares. A transcrição parcial do genoma produz mRNAs que serão processados por *splicing* e serão traduzidos nas glicoproteínas do envelope. A transcrição completa do genoma origina mRNAs com duas finalidades: servirem de molde para a tradução em proteínas (RT, proteína da matriz, do capsídeo) ou constituírem o RNA genômico para a morfogênese da progênie viral. Considerando-se que a transcrição do provírus que produz o RNA genômico é realizada pela maquinaria celular de transcrição, sem a participação de nenhum

fator viral, o genoma dos retrovírus é o único genoma viral a ser sintetizado exclusivamente por enzimas e fatores celulares (Figura 5.13).

3.6 Morfogênese, maturação e egresso

Os vírus das diversas famílias apresentam uma ampla diversidade estrutural, que vai desde partículas formadas pelo genoma e uma camada simples de proteínas até vírions altamente complexos. No entanto, independente da sua complexidade estrutural, uma série de interações entre os seus constituintes são necessárias para a montagem das partículas víricas e a conclusão do processo de replicação. Essas interações incluem: a) formação das unidades estruturais do capsídeo pela interação entre as respectivas proteínas; b) incorporação do genoma ao capsídeo pré-formado ou em formação; e c) liberação da progênie viral da célula infectada. No caso dos vírus envelopados, a formação no nucleocapsídeo é seguida pela aquisição do envelope a partir de membranas celulares, nas quais as proteínas virais foram previamente inseridas.

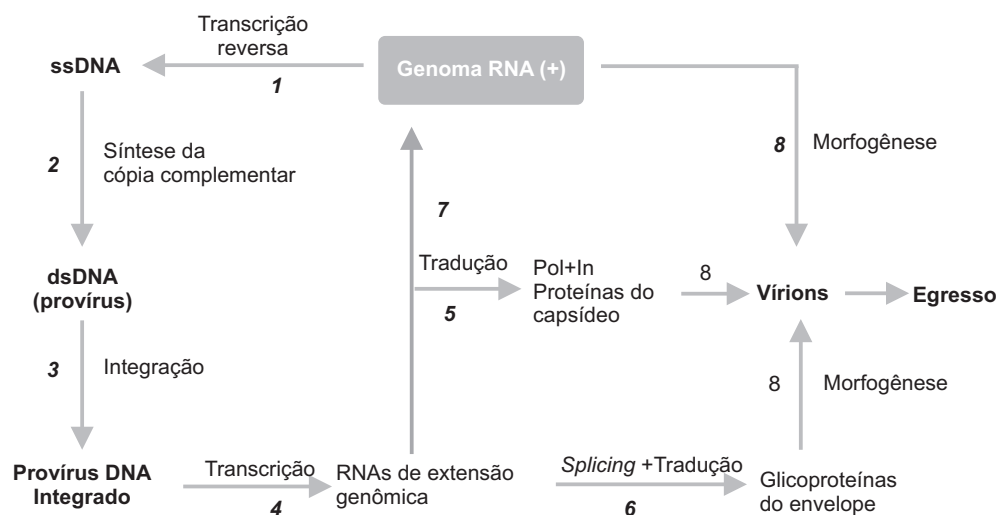


Figura 5.13. Ciclo replicativo dos vírus da classe V (*Retroviridae*). Logo após o desnudamento, a enzima viral transcriptase reversa (RT) sintetiza uma molécula de DNA complementar ao RNA genômico (1) que, em seguida, é convertida em DNA de cadeia dupla (dsDNA), também pela ação da RT (2). Esta molécula de dsDNA, denominada provírus, penetra no núcleo e é integrada no genoma da célula hospedeira pela atividade viral integrase (3). Os genes presentes no provírus são, então, transcritos pela RNA polIII celular, originando mRNAs de extensão subgenômica (4) para a tradução nas proteínas do envelope (5). A transcrição do provírus em toda a sua extensão resulta em mRNAs de extensão genômica (6), que podem ser traduzidos nas outras proteínas estruturais e polimerase viral (7) ou participam da morfogênese das partículas virais (8).

Diferentemente de células eucariotas e procaríotas, que se multiplicam por fissão binária, os vírions são formados pela associação de componentes pré-formados (genoma + proteínas). O processo de montagem das partículas víricas, que ocorre ao final do ciclo replicativo, é denominado genericamente de *morfogênese* ou *reunião*. A aquisição da capacidade infectiva pelas partículas víricas recém-formadas – que ocorre prévia ou concomitantemente com o seu egresso da célula – denomina-se *maturação*. Como, para muitos vírus, esses processos ocorrem simultaneamente, serão aqui abordados conjuntamente.

As diferentes etapas da formação da partícula vírica não ocorrem ao acaso. As associações entre os componentes são direcionadas e favorecidas por interações químicas específicas entre as unidades protéicas estruturais e entre estas e o ácido nucléico. Dependendo da estrutura e complexidade da partícula vírica, da estratégia e local de replicação, os vírus desenvolvem diferentes estratégias de morfogênese e maturação/egresso de sua progênie.

3.6.1 Maturação intracelular (citoplasmática ou nuclear)

Alguns vírus (principalmente os desprovidos de envelope) completam o processo de mor-

fogênese das partículas (e a conseqüente maturação) integralmente no citoplasma (vírus RNA) ou no núcleo (vírus DNA). Dessa forma, a progênie viral infecciosa pode ser encontrada nesses compartimentos, mesmo com a célula ainda íntegra, ou seja, a maturação ocorre previamente ao egresso. Esses vírus geralmente são liberados quando ocorre a destruição das células infectadas (Figura 5.14). Os vírus não-envelopados das famílias *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*, *Adenoviridae* e *Picornaviridae* e também os membros da *Poxviridae* e *Asfarviridae* (com envelope), enquadram-se nessa categoria.

3.6.2 Maturação por brotamento em membranas celulares

No ciclo replicativo dos vírus envelopados, as glicoproteínas do envelope recém-sintetizadas são inseridas em membranas celulares, isto é, na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), no aparelho de Golgi ou na membrana plasmática. Os nucleocapsídeos recém-formados interagem com a proteína da matriz e/ou com extremidades citoplasmáticas dessas glicoproteínas e inserem-se (ou projetam-se) através da membrana, incorporando o envoltório. Esse envoltório (envelope) é composto pela membrana lipídica dupla, contendo as glicoproteínas virais

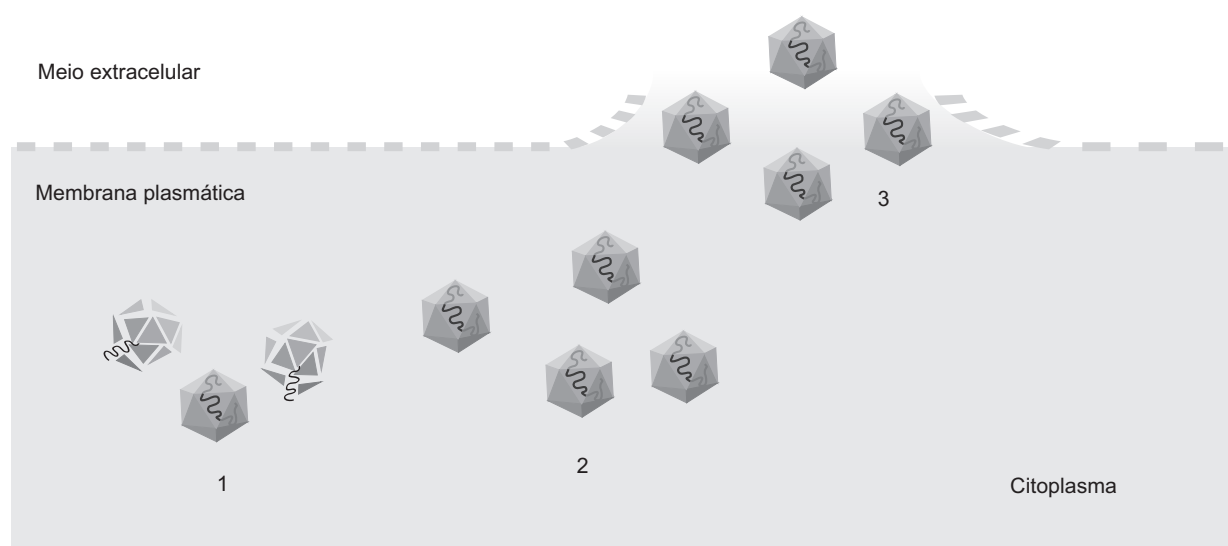


Figura 5.14. Maturação intracelular e egresso dos vírus sem envelope. Os componentes do capsídeo interagem entre si e com o genoma (1), resultando na formação de partículas víricas infecciosas (2), que são liberadas por lise celular (3).

inseridas. O processo de aquisição do envelope é denominado *brotamento*, pois o nucleocapsídeo literalmente *brot*a para o interior do RER (Figura 5.15), do Golgi ou para o exterior da célula (Figura 5.16). Os vírus que realizam brotamento em membranas celulares, como forma de adquirir o

envelope e completar a sua morfogênese/maturação, podem ser liberados por exocitose sem induzir necessariamente à lise da célula.

Os vírus RNA de sentido negativo, alguns vírus RNA de sentido positivo (togavírus) e os retrovírus completam a morfogênese e a maturação

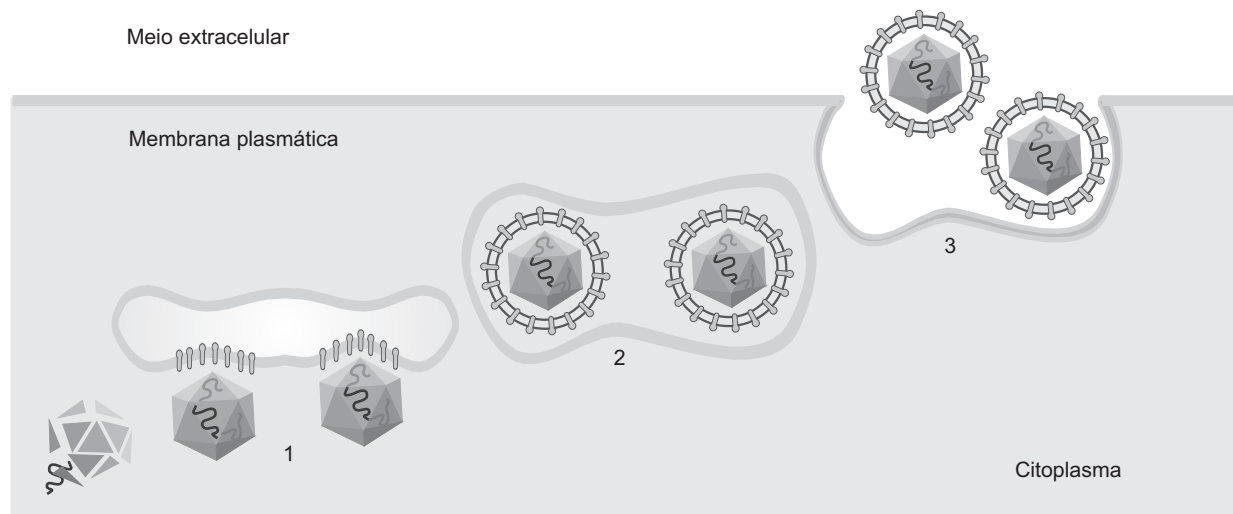


Figura 5.15. Maturação intracitoplasmática de vírus envelopados por brotamento em membranas celulares internas. Interação dos nucleocapsídeos com as caudas das glicoproteínas do envelope (1), brotamento e transporte no interior de vesículas (2), liberação por exocitose (3).

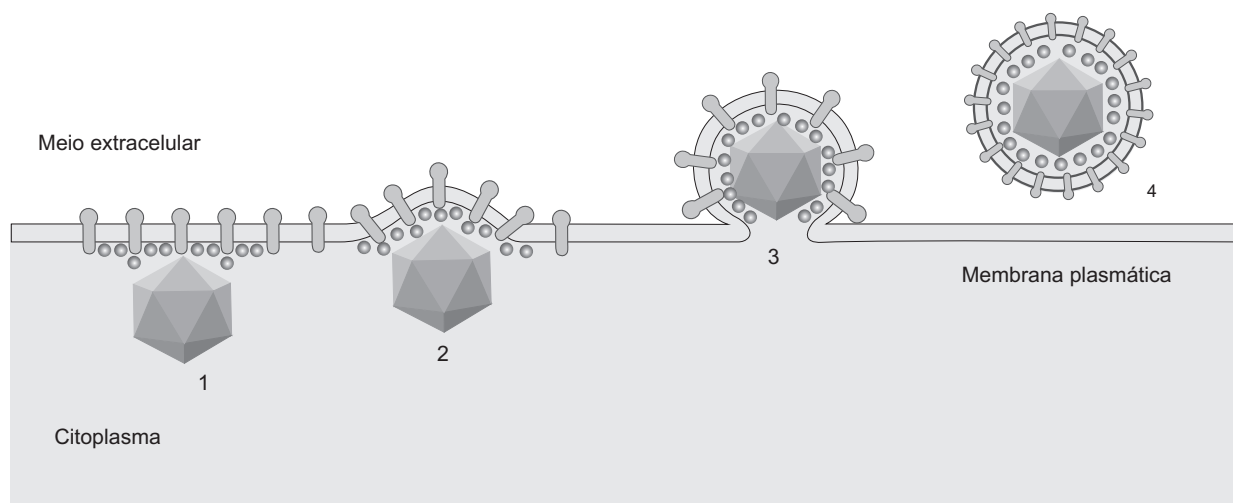


Figura 5.16. Brotamento e maturação de vírus envelopados na membrana plasmática. Interação do nucleocapsídeo com a proteína matriz e/ou caudas citoplasmáticas das glicoproteínas do envelope (1), brotamento através da membrana plasmática e aquisição do envelope (2, 3), egresso de partículas infecciosas (4).

somente no momento da liberação dos vírions na superfície da célula. Nesses casos, não é possível detectar progênie viral infecciosa no interior das células. Os vírions de outras famílias (*Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Bunyaviridae*, *Poxviridae*) realizam o brotamento no RER e/ou no aparelho de Golgi. Vírions infecciosos podem ser encontrados em vesículas citoplasmáticas derivadas desses compartimentos, nas quais são transportados até a membrana plasmática, onde são liberados por exocitose.

Os herpesvírus apresentam uma estratégia particular de morfogênese, maturação e egresso. A replicação do genoma e a montagem dos nucleocapsídeos ocorrem no núcleo, para onde as proteínas estruturais são importadas após a sua síntese no citoplasma. Os nucleocapsídeos podem adquirir o envelope pelo brotamento na membrana nuclear interna – vírions completos envelopados podem ser observados no espaço entre as membranas nucleares –. Esses nucleocapsídeos podem perder o envelope ao sair desse compartimento e readquirir o envelope pelo brotamento na membrana do RER. Nesses casos, são transportados em vesículas e liberados ao exterior por exocitose. Outros nucleocapsídeos podem ser transportados através do citoplasma até a membrana plasmática, onde adquirem o envelope por brotamento. Ao contrário de alguns vírus envelopados, que não são líticos, a replicação dos herpesvírus inevitavelmente leva à lise e à destruição celular.

Os efeitos da replicação viral na célula hospedeira são muito variáveis e vão desde infecções que não provocam alterações detectáveis até a morte e lise celular. As consequências da replicação viral em nível celular possuem importância na patogenia das doenças víricas. Esses temas serão abordados no Capítulo 8.

4 Bibliografia consultada

- BEAUD, G. Vaccinia virus DNA replication: a short review. *Biochimie*, v.77, p.774-779, 1995.
- BOEHMER, P. E.; LEHMAN, I.R. Herpes simplex virus DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, v.66, p.347-384, 1997.
- BROWN, P. O. 1997. Integration. In: COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (eds). **Retroviruses**. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, p.161-204.
- CANN, A.J. **Principles of Molecular Virology**. 2.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1997. 310p.
- CARRASCO, L. Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Letters*, v.350, p.151-154, 1994.
- FLINT, S.J. et al. **Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. 804p.
- HAY, R.T. et al. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.199, p.31-48, 1995.
- HISCOX, J.A. et al. The coronavirus infections bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *Journal of Virology*, v.75, p.506-512, 2001.
- HISCOX, J.A. The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Research*, v.95, p.13-22, 2003.
- HUNTER, E. Virus assembly. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.8, p.171-197.
- JOKLIK, W.K. The viral multiplication cycle. In: JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, D.B. (Eds). **Zinsser's microbiology**. 20.ed. Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1992. p.789-835.
- KLASSE, P.J.; BRON, R.; MARSH, M. Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.34, p.65-91, 1998.
- KLUMPP, K.; RUIGROK, R.W.; BAUDIN, F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *The EMBO Journal*, v.16, p.1248-1257, 1997.
- MARSH, M.; BOLZAU, E.; HELENIUS, A. Penetration of semliki forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell*, v.32, p.931-940, 1983.
- MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research*, v.36, p.107-151, 1989.
- MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.
- PELKMANS, L.; HELENIUS, A. Insider information: what viruses tell us about endocytosis? *Current Opinion in Cell Biology*, v.15, p.414-422, 2003.
- PENNINGTON, T.H. The replication of viruses. In: MAHY, B.W.J.; COLLIER, L.H. (Eds.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. 9.ed. London: Edward Arnold, 1998. v.1. p.23-32.

- PEREZ, L.; CARRASCO, L. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. **Journal of Virology**, v.67, p.4543-4548, 1993.
- PLOUBIDOU, A.; WAY, M. Viral transport and the cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, P.97-105, 2001.
- ROIZMAN, B.; PALESE, P. Multiplication of Viruses: an overview. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. *Cap.4*, p.101-111.
- SIECZKARSKI, S.B.; WHITTAKER, G.R. Dissecting virus entry via endocytosis. **The Journal of General Virology**, v.83, p.1535-1545, 2002.
- SMITH, A.E.; HELENIUS, A. How viruses enter animal cells. **Science**, v.304, p.237-242, 2004.
- SODEIK, B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. **Trends in Microbiology**, v.8, p.465-472, 2000.
- TAVIS, J.E. The replication strategy of the hepadnaviruses. **Viral Hepatitis Review**, v.2, p.205-218, 1996.
- WHITE, D.O.; FENNER, F. **Medical Virology**. 4.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1994. 610p.
- WHITTAKER, G.R.; KANN, M.; HELENIUS, A. Viral entry into the nucleus. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.16:627-651, 2000.
- WIMMER, E. **Cellular Receptors for Animal Viruses**. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 526p.

REPLICAÇÃO DOS VÍRUS DNA

Gustavo Delhon¹

6

1 Introdução	139
2 Poliomavírus	140
2.1 O ciclo replicativo	140
2.2 O genoma dos PoVs	142
2.3 Expressão dos genes iniciais	142
2.4 Replicação do DNA	144
2.5 Expressão dos genes tardios	145
2.6 Morfogênese e egresso	146
2.7 Conclusões	146
3 Papilomavírus	147
3.1 O ciclo replicativo	147
3.2 O genoma dos PpVs	147
3.3 Expressão dos genes iniciais	148
3.4 Replicação do DNA e interferência com o ciclo celular	148
3.5 Expressão dos genes tardios	150
3.6 Conclusões	151
4 Adenovírus	151
4.1 O ciclo replicativo	151
4.2 O genoma dos AdVs	151
4.3 Expressão dos genes iniciais	153
4.4 Replicação do DNA viral	154
4.5 Expressão dos genes tardios	154
4.6 Conclusões	156
5 Herpesvírus	156
5.1 O ciclo replicativo	156
5.2 O genoma dos HVs	156
5.3 Os genes virais	157
5.4 Expressão gênica	158
5.5 Replicação do DNA viral	159
5.6 Expressão gênica durante a infecção latente	160

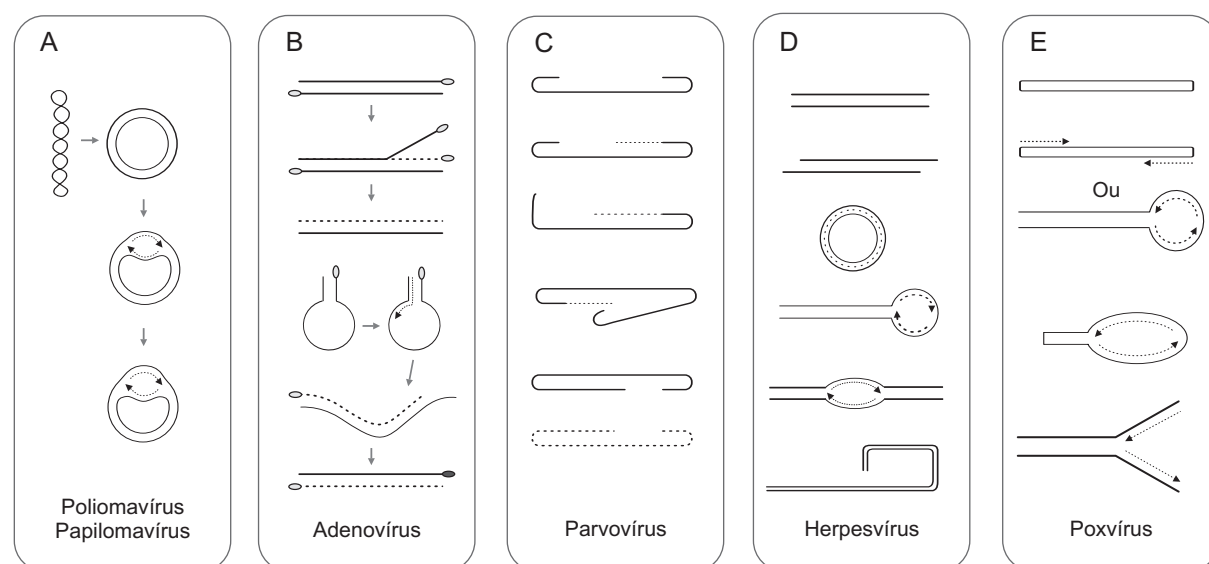
¹ Traduzido por Fernanda S.F.Vogel.

5.7 Conclusões	160
6 Poxvírus	160
6.1 O ciclo replicativo	160
6.2 O genoma dos PoxVs	160
6.3 Expressão gênica	161
6.4 Replicação do DNA	162
6.5 Conclusões	163
7 Bibliografia consultada	163

1 Introdução

A replicação dos vírus DNA é realizada pela ação orquestrada da maquinaria da célula hospedeira, associada com fatores codificados pelo vírus. A contribuição relativa dos fatores virais na replicação desses vírus, no entanto, varia muito entre as diferentes famílias. Em geral, os vírus DNA pequenos (parvovírus e poliomavírus) utilizam extensivamente a maquinaria celular, ou seja, os seus genomas codificam poucos produtos associados com funções replicativas. Por outro lado, os vírus DNA grandes (herpesvírus e poxvírus) codificam muitas enzimas e fatores envolvidos na replicação. Esses últimos seriam, teoricamente, menos dependentes da maquinaria celular para a replicação de seus genomas e a conseqüente produção da progênie viral. Dessa forma, qual seria a estratégia mais eficiente para a manutenção desses vírus na natureza? Na verdade, ambas, pois tanto os vírus DNA pequenos como os grandes têm conseguido se perpetuar, sugerindo que uma perfeita adaptação a um nicho tecidual é mais importante do que a complexidade do genoma e a estratégia de replicação.

Os mecanismos de replicação do genoma também variam entre os vírus DNA, de acordo com a estrutura e topologia do genoma e também com a participação relativa de fatores celulares e/ou virais (Figura 6.1). O genoma circular de cadeia dupla dos poliomavírus (e provavelmente dos papilomavírus), por exemplo, é replicado de forma bidirecional e semidescontínua, a partir de uma origem única. O complexo replicativo utiliza um *primer* de RNA para iniciar a síntese, e o mecanismo de replicação é semelhante ao utilizado pelas células eucariotas para replicar o DNA cromossômico. O genoma linear de fita dupla dos adenovírus possui uma origem em cada extremidade. A replicação ocorre em duas etapas, e cada cadeia parental é replicada em uma dessas etapas. O complexo replicativo utiliza uma oxidrila (OH) ligada a uma proteína viral (pTP), que está ligada em cada extremidade do genoma como iniciador da síntese de DNA (*protein priming*). A replicação dos genomas dos herpesvírus e poxvírus é mais complexa. O genoma dos herpesvírus possui três origens e parece ser replicado por um mecanismo de círculo rolante, no qual múltiplos lineares são produzidos e, posteriormente, clivados



Fonte: adaptada de Dulbecco e Ginsberg (1980).

Figura 6.1. Ilustração da replicação do genoma dos principais vírus DNA. Os estágios intermediários foram propostos a partir de estudos físico-químicos e, microscopia eletrônica, realizados a diferentes intervalos após a infecção.

em unidades genômicas. A replicação do genoma DNA linear de fita dupla dos poxvírus parece se iniciar com a clivagem de uma das cadeias próxima a alça terminal do genoma, seguida de alongação a partir da extremidade 3', gerada pela clivagem. A replicação do genoma DNA linear de fita simples dos parvovírus – não abordada neste capítulo – inicia-se com a alongação da extremidade 3' livre, que se encontra flexionada, e prossegue continuamente. Uma ilustração esquemática da replicação do genoma de diferentes vírus DNA está apresentada na Figura 6.1.

O objetivo fundamental da replicação viral é produzir progênie viral viável e abundante, que assegure a propagação do vírus e a conseqüente transmissão a novos hospedeiros. A produção de progênie depende da síntese de milhares de cópias do genoma viral e das proteínas componentes do vírion, associado com a montagem correta e liberação eficiente das partículas víricas. Esse processo envolve uma série de etapas reguladas temporal e espacialmente, que incluem a expressão de genes virais e a indução e/ou repressão de alguns genes do hospedeiro. Muitas vezes, a replicação viral está associada com alteração da fisiologia celular, o que pode determinar diferentes graus de patologia e até a morte da célula hospedeira.

Embora a grande maioria dos vírus DNA replique no núcleo, alguns deles desenvolveram estratégias especiais que permitem a sua replicação no citoplasma da célula hospedeira. No decorrer deste capítulo, serão abordados os aspectos replicativos das principais famílias de vírus DNA e a estratégia de replicação dos protótipos de cada família, enfatizando-se os aspectos moleculares e biológicos da expressão gênica, a interferência com funções celulares, para assegurar a replicação (entre elas a indução do ciclo celular), e a replicação do genoma propriamente dita. A replicação dos circovírus e parvovírus será abordada nos Capítulos 13 e 14, respectivamente. A replicação dos hepadnavírus será tratada, resumidamente, no capítulo destinado às famílias de interesse limitado em medicina veterinária.

Inicialmente, será descrita a replicação dos vírus da família *Polyomaviridae*, vírus relativamente simples, cuja estratégia de replicação tem

sido amplamente estudada. De fato, a replicação dos vírus DNA grandes pode ser considerada como uma evolução progressiva de complexidade quando comparada com os esquemas relativamente simples de replicação dos poliomavírus. A seguir, serão apresentados os principais aspectos da expressão gênica, replicação do genoma e interação com funções celulares dos papilomavírus, adenovírus, herpesvírus e poxvírus, respectivamente.

2 Poliomavírus

A família *Polyomaviridae* contém um único gênero, *Polyomavirus*, que inclui o protótipo da família, o vírus símio 40 (SV-40), e os vírus JC e BK, que têm sido, esporadicamente, associados com tumores em humanos. Os poliomavírus (PoVs) são vírus DNA pequenos, sem envelope, de simetria icosaédrica, que infectam um amplo espectro de hospedeiros – desde pássaros até humanos –. As infecções pelos PoVs são geralmente subclínicas. No entanto, a infecção de células que não suportam uma replicação produtiva frequentemente resulta em transformação neoplásica. Por isso, os PoVs são também conhecidos como os pequenos vírus DNA tumorais.

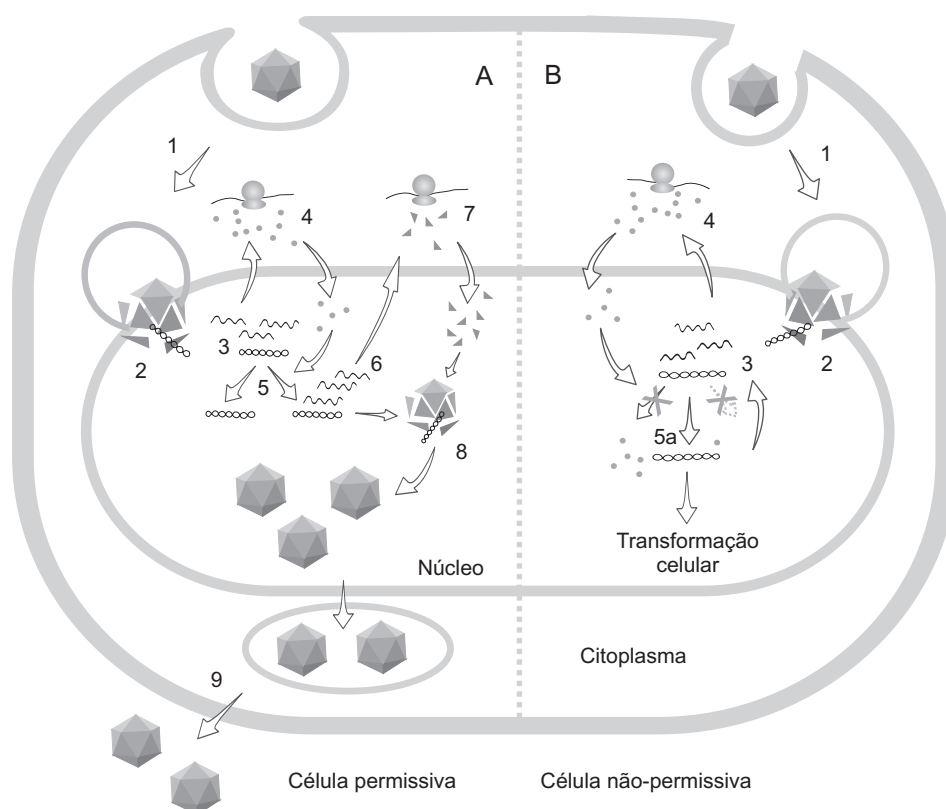
Apesar de sua pequena importância clínica, os PoVs foram alvo de intensivos estudos biológicos e moleculares, principalmente devido às suas propriedades tumorigênicas. As pesquisas com os PoVs elucidaram importantes aspectos da biologia celular. Dentre as maiores descobertas resultantes do estudo dos poliomavírus destacam-se: a) estrutura do DNA superenrolado, b) estrutura e função da origem da replicação do DNA, c) estrutura e função dos *promotores*, d) descoberta dos *enhancers* e o seu papel na expressão gênica, e) descoberta do mecanismo de *splicing* alternativo dos transcritos (RNA mensageiros, mRNA) e f) replicação do DNA cromossômico.

2.1 O ciclo replicativo

O mecanismo de penetração dos PoVs nas células hospedeiras ainda não está completamente esclarecido. Embora estudos recentes tenham demonstrado o envolvimento de moléculas do

complexo maior de histocompatibilidade do tipo I (MHC-I) como receptores para o SV-40, ainda não há evidências conclusivas nesse sentido. Após a ligação aos receptores, os vírions são internalizados por endocitose caveolar e transportados ao longo dos microtúbulos até o retículo endoplasmático. O mecanismo de transporte para o citoplasma e daí para o núcleo não está esclarecido, porém, sabe-se que o desnudamento do genoma ocorre no interior do núcleo. Após a sua liberação no nucleoplasma, o genoma é transcrito pela RNA polimerase II celular e, subsequentemente, repli-

cado. Os mRNA virais produzidos são processados por *splicing* e exportados para o citoplasma, onde são traduzidos. As proteínas virais recém-produzidas são transportadas de volta ao núcleo, onde participam da replicação do genoma e, posteriormente, da montagem das partículas víricas. Durante esse processo, os mRNA e as proteínas virais necessitam interagir com componentes da maquinaria celular responsável pela exportação e importação nuclear de macromoléculas. A morfogênese das partículas virais ocorre no núcleo. As partículas recém-formadas são transportadas



Fonte: adaptado de Cole e Conzen (2001).

Figura 6.2. Ciclo replicativo dos poliomavírus em células permissivas (A) e não-permissivas (B). A) Após a penetração do vírion (1), o genoma é desnudo no interior do núcleo (2), onde os genes iniciais são transcritos pela maquinaria celular de transcrição (3). Os mRNAs são traduzidos nas proteínas iniciais, ou seja, os antígenos T (4). Os antígenos T ingressam no núcleo e interagem com o DNA viral e com fatores da célula hospedeira, resultando na replicação do genoma (5). Após a replicação, os genes tardios são transcritos (6) e a tradução dos mRNAs origina as proteínas estruturais (7) que ingressam no núcleo e interagem com o genoma para formar as novas partículas víricas (8). Os vírions se acumulam no núcleo, são exportados em vesículas para o citoplasma e liberados por lise celular ou por exocitose (9). Em células não-permissivas (B), as etapas 1 a 4 ocorrem normalmente. No entanto, o antígeno T falha em interagir com os fatores celulares, não ocorrendo a replicação do DNA viral, nem a transcrição e expressão dos genes tardios. O DNA viral persiste no núcleo da célula (5a) e os genes dos antígenos T continuam sendo expressos (3, 4), podendo levar à imortalização e transformação celular. Não há replicação do genoma e nem produção de progênie viral.

até a superfície celular, no interior de vesículas, e liberadas por exocitose ou por lise celular, dependendo do tipo de célula.

A infecção de células permissivas resulta na ocorrência de todas essas etapas e na consequente produção de progênie viral infecciosa. Por outro lado, a infecção de células semipermissivas (geralmente de espécies heterólogas) resulta em replicação abortiva, na qual ocorre apenas a expressão dos genes iniciais, sem a replicação do genoma ou produção das proteínas tardias (proteínas estruturais). A persistência do genoma viral nessas células, associada com a expressão contínua dos antígenos T, pode levar à imortalização e transformação celular. As etapas do ciclo replicativo dos PoVs em células permissivas e não-permissivas estão representadas esquematicamente na Figura 6.2.

2.2 O genoma dos PoVs

O genoma dos PoVs é constituído por uma molécula de DNA de fita dupla circular, com aproximadamente 5.000 pares de bases (bp), que, na maioria dos PoVs, está associado com proteínas. O genoma desses vírus encontra-se associado com histonas celulares, formando estruturas semelhantes aos nucleossomos e assumindo uma configuração helicoidal semelhante à cromatina celular. Por essas razões, os seus genomas são geralmente denominados *minicromossomos* virais. A replicação do genoma do SV-40 é realizada basicamente por fatores e enzimas da célula hospedeira, com a participação de apenas uma proteína viral, o antígeno T. Por isso, a replicação do DNA do SV-40 tem sido utilizada como modelo para se estudar a replicação bidirecional semidescontínua do DNA cromossômico celular.

A organização do genoma do SV-40 está representada na Figura 6.3. Cerca de 90% da extensão do genoma é codificante, e os 10% restantes representam regiões não-traduzidas que possuem funções regulatórias. O genoma do SV-40 codifica seis proteínas, sendo três delas componentes da estrutura do capsídeo (VP1, VP2 e VP3) e três proteínas não-estruturais, denominadas antígeno T pequeno (sT) e grande (IT), e a proteína agno. A proteína agno parece participar na morfogênese

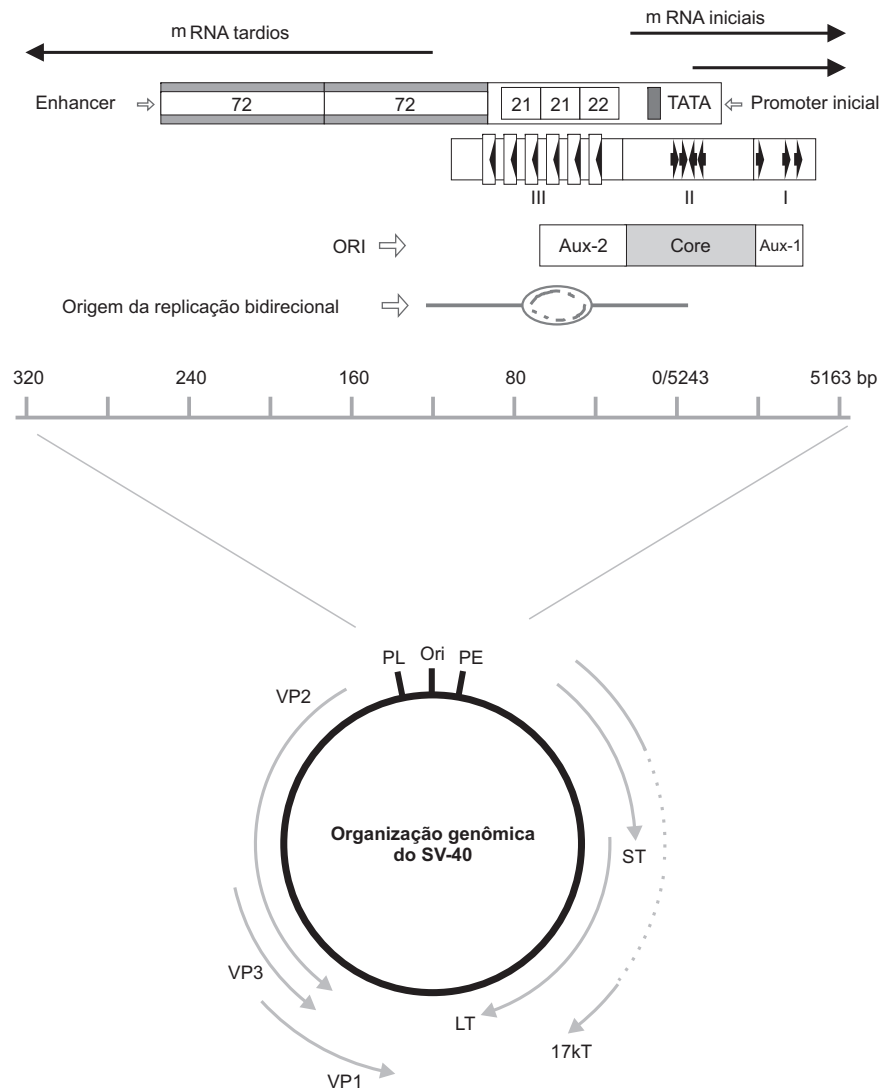
dos vírions, pois interage com a VP1. Os PoVs de roedores codificam uma terceira proteína T, o antígeno T médio (mT), e não codificam a proteína agno.

Em vez de possuírem regiões codificantes com seqüências regulatórias individuais, os PoVs solucionaram o problema do genoma pequeno realizando *splicing* alternativo em alguns transcritos, resultando, assim, na tradução em proteínas diferentes parcialmente homólogas. Além disso, o genoma apresenta uma concentração das seqüências regulatórias para a transcrição e replicação do DNA em uma pequena região, o que contribui para a compactação genética (Figura 6.3).

2.3 Expressão dos genes iniciais

Após o desnudamento do genoma no interior do núcleo, o minicromossoma do SV-40 é transcrito pelos complexos de transcrição da célula hospedeira (RNA pol II e fatores de transcrição). O primeiro gene a ser transcrito é o do antígeno T, e a sua transcrição contínua resulta em um acúmulo gradual do mRNA específico durante as primeiras 10 a 12 horas de infecção. Como os mRNA do antígeno T são os primeiros a serem transcritos e detectados, são denominados transcritos iniciais (E = *early*). Os transcritos primários do gene do antígeno T sofrem *splicing* alternativo para originar mRNAs, que serão traduzidos em duas proteínas: o antígeno T grande (IT) e pequeno (sT). Com isso, as proteínas IT e sT possuem parte de sua seqüência de aminoácidos em comum; sendo que o IT possui uma região adicional não presente no sT.

A transcrição dos genes iniciais é controlada por uma região regulatória de 250 pb, localizada imediatamente na direção 5' do sítio inicial de transcrição do gene do antígeno T (Figura 6.3). Essa região regulatória apresenta pequenas seqüências de nucleotídeos, dispostas em fila, ou motivos (*motifs*) que, juntos, constituem o promotor inicial do SV-40. Esses motivos atuam como sítios de ancoragem e ligação de componentes do aparato de transcrição celular, incluindo a RNA pol II e os fatores de transcrição. Logo acima do promotor (na direção 5'), existem duas cópias re-



Fonte: adaptado de Cole e Conzen (2001).

Figura 6.3. Estrutura e organização do genoma do SV-40 (inferior) e organização das regiões regulatórias da transcrição e replicação (superior). ORI: origem de replicação; PE: promotor dos genes iniciais; PL: promotor dos genes tardios; LT: mRNA do gene do antígeno T grande; sT: mRNA do gene do antígeno T pequeno; VP1, VP2 e VP3: mRNA das proteínas estruturais. >>: sítios de ligação do antígeno; I: sítio de regulação negativa da transcrição dos mRNA iniciais; II: sítios de ligação e separação do DNA para o início da replicação; III: sítios de regulação positiva da transcrição dos genes tardios.

petidas de 72 pb que atuam como *enhancers* do promotor. Essas seqüências de 72 pb são responsáveis pela ligação específica de fatores de transcrição, ou transativadores, cuja função é se ligar ao DNA e aumentar a eficiência da transcrição a partir do complexo basal de transcrição.

Alguns motivos presentes nos promotores e *enhancers* virais são encontrados também nas regiões regulatórias de certos genes das células

hospedeiras. Esse aspecto molecular é crucial para o parasitismo do vírus. Possuindo regiões regulatórias semelhantes às da célula hospedeira, o vírus pode seqüestrar os componentes da maquinaria celular de transcrição para sintetizar os seus mRNA.

Além disso, a região regulatória do SV-40 contém várias seqüências repetidas que servem de sítios de ligação para o antígeno LT, o que in-

dica que esta proteína regula a sua própria expressão. Quando a quantidade de antígeno IT, na célula infectada, atinge níveis altos, a ocupação desses sítios pelo próprio antígeno IT regula negativamente a transcrição do seu gene.

A próxima etapa do ciclo replicativo é a replicação do genoma viral. Como o genoma dos PoVs não codifica os produtos necessários à sua própria replicação, esses vírus dependem integralmente de enzimas e fatores celulares para replicar o seu DNA. No entanto, apenas um pequeno número de células no organismo encontra-se na fase S do ciclo celular, fase em que a célula expressa os fatores necessários para a replicação do DNA nuclear. A maioria das células do organismo já são diferenciadas ou são células que necessitam estímulos externos (fatores de crescimento, hormônios ou outros estímulos mitogênicos) para iniciar o ciclo celular. Os PoVs, assim como outros vírus DNA, solucionaram esse problema ao desenvolverem mecanismos para estimular as células a entrarem em fase S e, assim, produzirem os fatores necessários à replicação do seu genoma. Dessa maneira, o SV-40 é capaz de infectar de forma persistente células renais diferenciadas – e que não estão em divisão – de seu hospedeiro natural.

A replicação do DNA cromossômico das células ocorre durante a fase S do ciclo celular, mas a síntese e o acúmulo dos fatores necessários à replicação do DNA iniciam na fase anterior (G1). A transição entre as fases G1 e S é controlada parcialmente pela proteína do retinoblastoma (pRb) e pelas proteínas relacionadas p107 e p130. Em células que não estão em divisão, as proteínas da família Rb impedem o início da fase S pelo sequestro de fatores de transcrição que ativam os genes das enzimas relacionadas com a replicação do DNA, incluindo a DNA polimerase α . Após o estímulo mitogênico, a ciclina D liga-se nas cdk 4 e cdk 6, ativando-as, o que leva à hiperfosforilação das proteínas Rb e resulta na liberação dos fatores de transcrição (E2F) e início da fase S.

Outros fatores também estão envolvidos no controle da transição entre as fases G1 e S. O fator de transcrição p53 pode prevenir a síntese não-programada de DNA e bloquear o início da fase S quando são detectadas lesões no DNA celular.

Dependendo do estágio fisiológico da célula, a p53 pode retardar o progresso do ciclo celular ou induzir *apoptose*. Pelo seu papel na transição G-S1, tanto a pRb como a p53 podem ser consideradas guardiãs que evitam a divisão celular extemporânea e a transformação maligna das células. Por isso, são conhecidas como proteínas antioncogênicas.

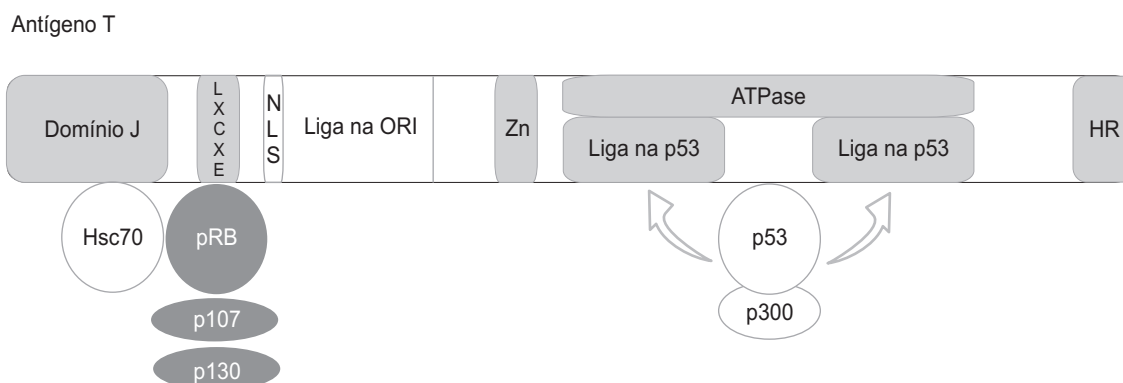
Apesar desses mecanismos de controle do ciclo celular, os PoVs conseguem induzir o início da fase S em células quiescentes porque o antígeno IT dos PoVs exerce um importante papel, alterando o controle do ciclo celular por interagir diretamente com a proteína Rb e, em alguns PoVs, também com a p53. Um pequeno domínio próximo a região N-terminal do antígeno IT se liga especificamente às proteínas da família Rb, enquanto seqüências próximas à região C-terminal são requeridas para a associação com a p53 (Figura 6.4). As conseqüências dessas interações são a inibição da função da pRb e p53 e a conseqüente expressão dos produtos necessários à replicação do DNA viral e também celular.

Além do efeito da ligação nas pRbs, o antígeno IT é capaz de estimular diretamente os promotores dos genes envolvidos no controle do ciclo celular, incluindo os genes que codificam as ciclinas. Dessa forma, o antígeno IT utiliza dois mecanismos para assegurar que a célula infectada entre em fase S e, assim, propicie um ambiente favorável à replicação viral.

A função exata do antígeno T pequeno (sT) durante a infecção produtiva ainda não está completamente esclarecida, porém sabe-se que esta proteína é capaz de interagir com a fosfatase 2, uma enzima reguladora do ciclo celular. Assim, o sT poderia colaborar com o IT na indução da fase S em células infectadas.

2.4 Replicação do DNA

A replicação do DNA circular dos PoVs envolve o relaxamento e a separação das cadeias do DNA, a síntese das cadeias filhas de DNA e a resolução e a separação das moléculas replicadas. O multifuncional antígeno IT exerce um papel fundamental no início da replicação do DNA viral ao se ligar em seqüências regulatórias, localiza-



Fonte: adaptado de Cole e Conzen (2001).

Figura 6.4. Estrutura funcional do antígeno T do SV-40. Nessa representação, estão indicados os motivos funcionais do IT. Domínio J: sítio de ligação da proteína Hsc70; LXCXE: sítio de ligação das proteínas da família pRb; NLS: sinal para localização nuclear; sítio de ligação na ORI; sítio de ligação de Zn²⁺; sítio com atividade ATPase; sítios de ligação nas proteínas p53; HR: sítio envolvido na determinação do host range.

das nas proximidades do promotor/*enhancer* do genoma do SV-40. Essa região, conhecida por origem da replicação (*ori*), consiste de uma sequência central de 64 nucleotídeos, flanqueada por sequências auxiliares (Figura 6.3). Como outras proteínas que se ligam ao DNA, o antígeno IT oligomeriza ao interagir com os sítios específicos na *ori*. Hexâmeros do IT formam um anel duplo ao redor da *ori* e promovem a separação das cadeias do DNA viral nesse local. Esse processo é dependente de energia, que é fornecida pela hidrólise de ATP catalisada por uma atividade ATPase do próprio antígeno T (Figura 6.4).

As regiões de fita simples do DNA associam-se, então, com a proteína replicativa A (RPA), que é uma proteína celular que se liga e mantém as regiões de fita simples separadas. Isso permite a separação bidirecional das cadeias mediada pelo antígeno IT, expondo regiões de cadeia simples para a processividade da replicação. O recrutamento da DNA polimerase α (*primase*) e da *topoisomerase I* resulta na formação do complexo de iniciação. A etapa de elongação envolve a síntese bidirecional do DNA, que é precedida pela atividade helicase do antígeno IT, que se move à frente do complexo replicativo (Figura 6.1A). Os fatores do hospedeiro (PCNA e a DNA polimerase δ) participam da síntese das cadeias *leading*

(contínua) e *lagging* (descontínua). A *exonuclease* e *ligase I* da célula hospedeira são necessárias para a remoção dos *primers* e ligação dos *fragmentos de Okazaki*, produzidos pela replicação descontínua de uma das cadeias. Como as cadeias parental e recém-replicada de DNA, são circulares e permanecem entrelaçadas. A próxima etapa envolve a separação dessas moléculas pela ação da enzima celular *topoisomerase II* (Figura 6.1). As histonas acumuladas no núcleo celular durante a fase S se associam com os genomas virais recém-replicados, formando, assim, uma progênie de minicromossomos. As células infectadas contêm mais de 200.000 cópias de DNA viral e, aproximadamente, 50% destes são encapsidados para formar a progênie viral. Em resumo, a replicação do DNA do SV-40 compartilha várias etapas e componentes essenciais envolvidos na replicação do DNA da célula hospedeira.

2.5 Expressão dos genes tardios

A replicação do DNA viral provoca uma alteração no padrão de expressão gênica, favorecendo a transcrição e expressão dos genes tardios (*L = late*), que codificam as proteínas do capsídeo. O mecanismo de transição, passando da expressão dos genes iniciais para a expressão

dos tardios não é bem conhecido. A redistribuição dos nucleossomos nas regiões regulatórias do genoma possivelmente desempenhe alguma função nesse processo, pois resulta na exposição dos sítios regulatórios dos genes tardios para o reconhecimento pelo aparato celular de transcrição. O promotor que direciona a expressão dos mRNA tardios possui alguns motivos presentes também nos sítios regulatórios dos genes iniciais, incluindo as seqüências para a ligação do antígeno IT.

Dois mRNA tardios principais são transcritos na direção oposta aos mRNA iniciais e sofrem *splicing* alternativo. Os mRNA pequenos são traduzidos na proteína VP1 do capsídeo, e os transcritos grandes originam a VP2 e VP3. Como a seqüência que codifica a VP3 está contida na seqüência da VP2, a VP3 poderia ser produzida pela clivagem da proteína VP2. No entanto, tem sido demonstrado que a tradução e síntese da VP3 e VP2 são independentes.

A quantidade de mRNA tardios nas células infectadas é muito superior a dos mRNA iniciais. Isso se explica pelo fato de que uma única partícula vírica contém 360 moléculas de VP1. Portanto, para uma progênie viral de 10^5 vírions por célula, são necessárias $3.6 \times 10^{7-8}$ moléculas de VP1. Assumindo que cada molécula de mRNA pode originar de 5.000 a 10.000 moléculas de VP1, mais de 30.000 moléculas de mRNA da VP1 seriam necessárias para a produção de proteína suficiente para encapsidar a progênie viral. O acúmulo da progênie de minicromossomos durante a replicação do DNA viral, com a conseqüente amplificação dos moldes DNA e a ativação da transcrição pelo antígeno IT, são os responsáveis pelos níveis altos de mRNA tardios nas células infectadas.

Recentemente, foi relatado que microRNAs (miRNAs) são transcritos do genoma do SV-40 em fases tardias da infecção. Os miRNAs são pequenos (aproximadamente 20 nt) e desempenham funções regulatórias na expressão gênica de eucariotas. A hibridização desses miRNAs com determinados mRNA-alvos resulta no silenciamento dos genes correspondentes. Esse silenciamento pode ocorrer por interferência com a tradução ou pela degradação dos mRNA. Assim,

dois mecanismos atuam para reduzir a expressão do antígeno IT em fases tardias da infecção: a repressão da transcrição pelo próprio antígeno IT e a interferência pelos miRNAs. Surpreendentemente, células infectadas com isolados de campo do SV-40 são menos susceptíveis à lise por linfócitos T citotóxicos do que células infectadas com cepas mutantes que não induzem a síntese de miRNAs. Provavelmente, a capacidade de síntese de miRNA se constitua em um mecanismo de evolução viral, permitindo a esses vírus escaparem da vigilância do sistema imunológico.

2.6 Morfogênese e egresso

Após a síntese no citoplasma, as proteínas virais VP1, VP2 e VP3 são transportadas para o interior do núcleo para a montagem dos vírions. Esse transporte é mediado por sinais de localização nuclear (NLS, seqüências específicas de aminoácidos) presentes nessas proteínas. Essas seqüências são responsáveis pela interação das proteínas virais com o aparato de importação nuclear.

O mecanismo de montagem das partículas virais (morfogênese) dos poliomavírus não é conhecido. Capsídeos vazios podem ser inicialmente pré-formados, seguidos da incorporação dos genomas (como minicromossomos). Alternativamente, os capsômeros individuais formados pelos pentâmeros da VP1, associados com a VP2 e com a VP3, podem interagir como o minicromossomo para a montagem dos capsídeos. A proteína agno, uma proteína altamente básica, codificada pela região líder dos mRNA tardios de alguns PoVs, facilita a morfogênese por interagir com a VP1. Nos PoVs de humanos, a agnoproteína atua também na transcrição e replicação do DNA.

2.7 Conclusões

A importância crítica de uma única proteína – o antígeno IT – em várias etapas do ciclo replicativo, como a transcrição, indução da fase S e replicação do DNA, constitui-se em um aspecto único da família *Polyomaviridae*. O antígeno IT é o protagonista principal e possui várias atividades

biológicas. Atua como regulador da transcrição viral, como proteína ligante de DNA, possui atividade helicase e ATPase e de *chaperone*, além de interagir com várias proteínas da célula hospedeira. A atividade do antígeno IT é regulada por várias modificações pós-tradução, como fosforilação, glicosilação, acetilação e adenilação.

Os PoVs são também conhecidos como pequenos vírus DNA tumorais, por causa de sua capacidade de induzir a formação de tumores. A infecção de células não-permissivas pode resultar em replicação abortiva. No entanto, a integração freqüente do genoma viral nos cromossomos da célula hospedeira pode resultar em expressão contínua das proteínas iniciais. O antígeno T possui um papel decisivo nos processos de imortalização, transformação celular e oncogênese, provavelmente por suas interações com múltiplos fatores celulares e pela interferência com a regulação do ciclo celular.

3 Papilomavírus

A família *Papillomaviridae* possui apenas o gênero *Papillomavirus*, que inclui vários vírus de mamíferos e de aves. Esses vírus estão freqüentemente associados com lesões proliferativas na epiderme e nas mucosas (papilomas ou verrugas). Além de células epiteliais, alguns papilomavírus (PpVs) também infectam células do tecido conjuntivo, causando fibropapilomas (p. ex.: papilomavírus bovino-1, BPV-1). As lesões causadas pelos PpVs são geralmente benignas, mas alguns desses vírus estão associados com a produção de neoplasias malignas.

Os vírions dos PpVs são icosaédricos, sem envelope e possuem aproximadamente 55 nm de diâmetro. O genoma consiste de uma molécula de DNA de fita dupla circular, com 6.800 a 8.400 pb que, a exemplo dos poliomavírus, está associada com histonas da célula hospedeira, formando um complexo semelhante à cromatina celular (minicromossomo).

3.1 O ciclo replicativo

O ciclo replicativo dos PpVs está estreitamente associado com o processo de diferenciação

dos queratinócitos (ou das células equivalentes em superfícies não-cutâneas). Na epiderme, os queratinócitos representam cerca de 90% das células e encontram-se em diferentes fases de diferenciação. As células menos diferenciadas estão localizadas no compartimento basal (estrato germinativo), e as mais diferenciadas localizam-se no compartimento apical (estrato córneo). As células em estágios intermediários de diferenciação estão localizadas nos estratos granuloso e espinhoso. As células-tronco do compartimento basal se multiplicam de forma assimétrica, originando outras células-tronco e também células de transição para a posterior diferenciação. Essas últimas deixam o estrato basal e penetram no estrato espinhoso, onde iniciam o processo de diferenciação celular. O ritmo de multiplicação das células basais assegura uma substituição contínua das células escamosas da superfície apical que vão sendo desfoliadas.

A infecção de animais e pessoas pelos PpVs provavelmente ocorre por meio de microlesões, que expõem o compartimento basal, permitindo a penetração e início da replicação viral. A ligação dos vírus às células é mediada pelo sulfato de heparina. No entanto, não se conhecem os receptores específicos que mediam a ligação e penetração do vírus nas células e tampouco o mecanismo de desnudamento.

A infecção das células basais não é produtiva, ou seja, não resulta na produção de progênie viral. O ciclo replicativo inicia nessas células com a expressão limitada de genes virais (genes iniciais) e replicação do DNA. No entanto, a replicação só é completada nas células diferenciadas, onde ocorre a amplificação do DNA viral, a expressão dos genes tardios, a morfogênese e egresso da progênie viral. Embora as células basais representem a fonte de fatores de replicação, a infecção viral necessita de fatores que somente estão presentes em células que estão na fase S, para assegurar a expressão temporal dos genes e a replicação do genoma.

3.2 O genoma dos PpVs

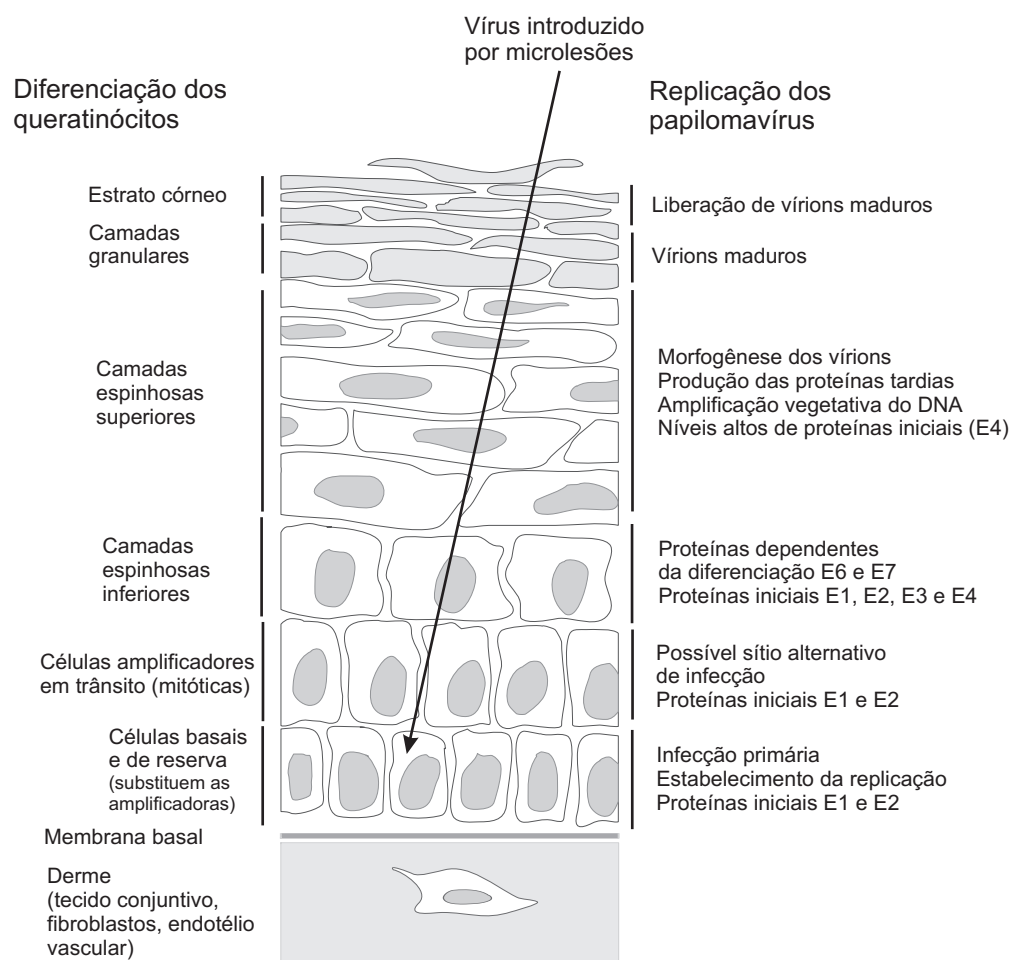
A Figura 6.5 apresenta a organização do genoma do papilomavírus bovino tipo 1 (BPV-1).

tando na produção das cópias de DNA a serem encapsuladas na progênie viral. É importante salientar que todas as fases da replicação do DNA viral ocorrem em sincronia com a replicação dos cromossomos da célula hospedeira.

A replicação do DNA viral no compartimento basal produz entre 20 e 100 cópias do genoma, que são mantidos como DNAs extracromossômicos no núcleo da célula hospedeira. Os genomas virais são fielmente distribuídos entre as células-filhas, e o processo de replicação só é reiniciado nos queratinócitos em estágios avançados de diferenciação (Figura 6.6).

A amplificação dos genomas virais que ocorre em queratinócitos diferenciados, denomi-

nada replicação vegetativa do DNA, representa um desafio para o vírus, pois essas células encontram-se na fase G0 do ciclo celular. Acredita-se que duas pequenas proteínas virais, a E6 e a E7, sejam responsáveis pela criação de um ambiente favorável para a replicação vegetativa. Essas proteínas também desempenham um papel central na transformação celular e na indução de neoplasias, especialmente nos PpVs humanos de alto risco. De fato, sabe-se muito mais sobre o papel dessas proteínas na transformação celular do que em infecções produtivas. Por isso, deve-se analisar com cautela as informações a respeito do provável papel da E6 e da E7 na infecção produtiva no contexto da replicação vegetativa do DNA.



Fonte: adaptado de Chow e Broker (1997).

Figura 6.6. Diferenciação do epitélio cutâneo e etapas da replicação dos papilomavírus em infecções benignas (não-tumorais). As fases de diferenciação celular estão apresentadas à esquerda da figura; e as etapas do ciclo replicativo estão apresentadas à direita.

De forma semelhante ao antígeno IT dos PoVs, as E6 e E7 dos PpVs interagem com as proteínas celulares pRb e p53, que são proteínas antioncogênicas envolvidas no controle do ciclo celular. Quando a E6 é expressa em camundongos transgênicos, ocorre a hiperproliferação do epitélio e o desenvolvimento de tumores epiteliais. Esses efeitos dependem parcialmente da habilidade da E6 de se ligar à p53 e recrutar uma ligase celular, que adiciona uma ubiquitina, a p53, direcionando-a a degradação. A E6, então, ao remover a p53, que é envolvida no controle do ciclo celular, estimularia a célula a entrar em fase S e retardaria a apoptose.

Estudos recentes sugerem que, além dos efeitos mediados pela interação com a p53, a E6 pode interferir com o ciclo e na sobrevivência celular por outros mecanismos. A E6 induz a hiperfosforilação e inativação da pRb, o que é importante para entrada da célula na fase S. Também induz a expressão da telomerase, uma enzima que replica as extremidades do DNA e impede o encurtamento dos cromossomos após a divisão celular. A inativação da pRb e a expressão da telomerase são importantes no processo de immortalização de células pelos PpVs. Além disso, a E6 pode interagir com a BAK, que é uma proteína pró-apoptose, que é expressa em altos níveis na camada apical do epitélio estratificado. Assim como a p53, a interação da E6 com a BAK resulta na ubiquitinação e posterior degradação da BAK. Por induzir a degradação da p53 e BAK, a E6 impede ou reduz a probabilidade da célula infectada sofrer apoptose em resposta à infecção, aumentando o tempo para o vírus completar o seu ciclo replicativo.

A E7 interage com várias proteínas celulares envolvidas no controle do ciclo e na diferenciação celular, incluindo os membros da família das proteínas pRb, as deacetilases de histonas, as ciclinas, cdk's e fatores de transcrição da família dos AP-1. Embora o significado de várias dessas interações permaneça incerto, sabe-se que a ligação da E7 com a pRb resulta na degradação da pRb e na conseqüente liberação do fator de transcrição E2F. A interação da E7 com fatores de transcrição AP-1 está associada com a modulação da transcrição de genes envolvidos com resposta inicial a sinais mitogênicos.

Em resumo, a E6 e a E7 atuam sobre reguladores importantes do ciclo celular e da sobrevivência das células infectadas, com o objetivo de proporcionar tempo suficiente para assegurar a replicação e produção de progênie viral em células diferenciadas. A progressão do ciclo e a diferenciação celular são eventos mutuamente excluídos. De fato, a progressão não-programada do ciclo celular em células diferenciadas geralmente leva à morte celular. Assim, a E6 e a E7, ao influenciarem simultaneamente o ciclo celular e o mecanismo de sobrevivência, são capazes de resolver o impasse que levaria à morte celular.

Além do papel da E6 e E7, experimentos *in vitro* têm demonstrado que a E5 do BPV-1 ativa o receptor para o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), uma proteína que se liga ao PDGF e proporciona o sinal mitogênico. Assim, por mimetizar o PDGF, a E5 é capaz de criar sinais adicionais para criar um ambiente de fase S propício à replicação viral.

3.5 Expressão dos genes tardios

A transcrição dos genes tardios é controlada por um promotor, que é estimulado por fatores de transcrição presentes somente em queratinócitos em fase final de diferenciação. Isso pode explicar porque a síntese das proteínas estruturais e a morfogênese das partículas virais ocorrem apenas em células diferenciadas. No entanto, evidências indicam que a expressão dos genes tardios em queratinócitos menos diferenciados é reprimida por fatores do hospedeiro. Isso indica que a regulação dos genes tardios e a conseqüente continuação do ciclo podem estar sujeitas tanto a regulação positiva como negativa, ambas dependentes de condições e fatores associados com o estágio de diferenciação celular.

O mesmo promotor tardio direciona a síntese de mRNAs que codificam a E4, uma das proteínas menos conservadas dos PpV. Dessa forma, embora o gene da E4 esteja localizado na região dos genes iniciais, é expresso em fases tardias. O gene da E4 é completamente sobreposto ao gene da E2. No entanto, a sua seqüência de aminoácidos é codificada por uma ORF diferente, fazendo com que as seqüências de aminoácidos da E2 e

da E4 sejam completamente diferentes. A E4 se associa com a queratina e, quando é expressa em altos níveis, pode induzir o colapso da cadeia de queratina. Com base nessas observações, é provável que a E4 participe da replicação, facilitando o egresso das partículas víricas.

3.6 Conclusões

Os PpVs dependem da diferenciação do epitélio para completar o seu ciclo de replicação, e a expressão dos seus genes é regulada à medida que as células basais migram em direção à superfície do epitélio. Os produtos virais não apenas controlam a expressão gênica dos genes virais e a replicação do DNA viral como também modulam o ciclo celular e os programas de apoptose para assegurar a produção de progênie viral. Em algumas circunstâncias, infecções abortivas, sem a realização completa do ciclo replicativo viral, podem ocorrer. A exemplo de outros vírus DNA pequenos, essas infecções abortivas podem resultar em transformações neoplásicas.

4 Adenovírus

A *Adenoviridae* é uma família de vírus DNA grandes, não-envelopados, que infectam vertebrados e produzem enfermidade leve no trato respiratório, gastrointestinal e genitourinário. Os adenovírus (AdVs) possuem a capacidade de infectar uma grande variedade de células que não estão em divisão. Por isso, têm sido muito utilizados como vetores para a transferência de genes e também para vacinas vetorais. Por essas razões, a biologia molecular dos AdVs é conhecida com detalhes.

4.1 O ciclo replicativo

Aproximadamente após 40 minutos da penetração na célula, os vírions podem ser observados próximos ao núcleo. A internalização parece ativar a protease viral L3, que inicia o desmonte da partícula vírica. A proteína terminal (TP), que é uma proteína que está associada de forma covalente na extremidade 5' do genoma, contém sinais de localização nuclear, que são encarregados

de mediar a importação do genoma viral para o núcleo da célula hospedeira.

A expressão gênica do AdVs divide-se em fases inicial e tardia. As proteínas iniciais são necessárias para a transcrição dos genes virais e para a replicação do DNA. Também estão envolvidas com a interferência com os mecanismos inflamatórios e de apoptose desencadeados pelo hospedeiro. Após a replicação do DNA, ocorre a expressão dos genes tardios, cujos produtos são, em sua maioria, componentes estruturais das partículas víricas. O ciclo replicativo se completa em 20 a 24 horas e resulta na produção de aproximadamente 10^4 partículas víricas por célula infectada.

Embora a divisão da expressão gênica em fases inicial e tardia seja conveniente do ponto de vista didático, o limite exato entre essas fases não é claro. Por exemplo, alguns genes iniciais continuam a ser expressos em fases tardias da infecção; e baixos níveis de expressão de genes tardios podem ser detectados já no início da infecção. Essa sobreposição da expressão gênica inicial/tardia é também observada durante a replicação de outros vírus DNA.

4.2 O genoma dos AdVs

Os genomas dos AdVs de mamíferos são constituídos por moléculas lineares de DNA de fita dupla, com aproximadamente 35 kb. Sequências repetidas invertidas (ITRs) com 36 a 200 pb são encontradas nas regiões terminais do genoma. O genoma encontra-se associado com quatro proteínas virais (V, VII, X and TP) para formar o núcleo (ou core) da partícula viral. A proteína V provavelmente medeia as interações entre o núcleo e o capsídeo. Maiores detalhes da estrutura das partículas víricas dos adenovírus estão apresentados no Capítulo 16.

Embora a organização genômica seja conservada dentro dos gêneros, diferenças importantes podem ser observadas entre vírus de gêneros diferentes. A maioria dos genes gênero-específicos se localiza próxima às extremidades do genoma, enquanto os genes conservados na família tendem a se concentrar na região central. Essa característica também é observada em outros vírus

Biologia foi a descoberta do *splicing* de RNA realizada durante estudos de expressão gênica.

A maioria das unidades de transcrição codifica uma série de polipeptídeos com funções relacionadas. Por exemplo, a unidade E1A codifica duas proteínas que ativam a transcrição e induzem a célula hospedeira a entrar na fase S, enquanto a E2 codifica três proteínas que atuam na replicação do DNA viral.

4.3 Expressão dos genes iniciais

A região da E1A, a primeira unidade transcripcional a ser expressa, resulta em um transcrito primário único, que é processado por *splicing* diferencial em dois mRNAs. Os seus produtos, as proteínas 12S e 13S (em razão de diferenças no coeficiente de sedimentação dos mRNA), são idênticas, com exceção de 46 aminoácidos adicionais presentes na E1A 13S.

Uma função importante das proteínas E1A é estimular a transcrição generalizada de genes virais. Essa função depende da habilidade das proteínas E1A de se ligarem em uma variedade de fatores regulatórios da transcrição celular, como as proteínas CREB, AP1 e fatores basais de transcrição como a proteína ligante do TATA (TBP). A ligação da E1A nesses fatores é mediada pelos domínios conservados CR1 e CR2 (12S e 13S) e CR3 (somente na 13S). Uma interação crítica ocorre entre o CR3 e a subunidade mediadora MED23, que estimula a montagem do complexo de pré-iniciação nos promotores dos genes iniciais e, provavelmente, também aumenta a taxa de início da transcrição desses genes.

As proteínas E1A também desempenham um papel importante de indução do ciclo celular. A exemplo dos poliomavírus, as proteínas iniciais dos AdVs focalizam a sua ação nos reguladores principais do ciclo celular, a pRb e p53. A interação entre as E1A e a pRb resulta na dissociação dos complexos E2F-pRb e ativação da transcrição de genes cujos produtos promovem a entrada na fase S. Interessantemente, a E2F também se liga e ativa os promotores da E1 e E2. Isso provavelmente represente um mecanismo para coordenar a progressão do ciclo celular com a expressão gênica e replicação do DNA viral.

As proteínas E1A inibem a p300/CBP, uma proteína que modifica a estrutura da cromatina para facilitar a atividade de fatores de transcrição, como a p53. Ao se ligar na p300/CBP, as proteínas E1A antagonizam a ação da p53, liberando o bloqueio para a progressão do ciclo celular. Além disso, a E1B de certos AdVs pode se ligar diretamente e bloquear a p53. A razão por que os AdVs (e também os poliovírus e papilomavírus) utilizam dois mecanismos para estimular o ciclo celular é desconhecida. Uma possibilidade é que, *in vivo*, podem existir células nas quais um dos mecanismos é mais eficiente do que o outro. Uma análise mutacional demonstrou que, embora a ligação da E1A nas proteínas pRb ou p300/CBP possa induzir a síntese de DNA em células quiescentes, ambas as regiões são necessárias para induzir a fase M, sugerindo que eventos tardios do ciclo celular são, provavelmente, requeridos para assegurar uma replicação viral eficiente. Funções virais que induzem a progressão do ciclo celular estão envolvidas na transformação de células de cultivo por alguns sorotipos dos AdVs. No entanto, nenhum AdV tem sido associado com tumores em seu hospedeiro natural.

Os AdVs induzem apoptose na célula hospedeira em fases iniciais da infecção, principalmente através de efeitos indiretos da E1A. Por outro lado, várias proteínas virais, incluindo as E1B/55 kDa, E1B/19 kDa e E4orf6, atuam bloqueando a apoptose por vários mecanismos. A E1B e E4orf6 bloqueiam o mecanismo pró-apoptótico dependente da p53, ligando-se e inativando essa proteína. A E1B/19 kDa é semelhante à proteína celular antiapoptótica Bcl-2, que se localiza na membrana mitocondrial e impede a ativação da caspase-9, uma efetora da apoptose. Mutantes do AdVs defectivos na E1B/19 kDa induzem morte celular rápida, resultando em produção de progênie viral em quantidade reduzida quando comparada com o vírus de campo.

A sobrevivência das células infectadas também depende da interferência com sinais de morte celular induzidos pela resposta imune. A E3 19 kDa é uma glicoproteína transmembrana que fica retida no retículo endoplasmático (RE) e cujo domínio luminal se liga em moléculas do MHC-I, provocando a sua retenção no RE. A E3 19 kDa

também se liga no complexo TAP e o impede de transferir peptídeos ao MHC-I. O efeito dessas atividades é a proteção das células infectadas do reconhecimento e lise mediada por linfócitos T citotóxicos (CTLs). Os CTLs também podem induzir lise celular, desencadeando sinais através do receptor de *Fas* expresso nas células-alvo. O complexo viral E3 14.4-kDa/E3 10.4-kDa interfere com a apoptose mediada pelo *Fas*, induzindo a degradação do seu receptor. Além disso, esse complexo também inibe a lise celular pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α), uma citocina antiviral potente. Provavelmente, as atividades imunomodulatórias das proteínas E3 dos AdVs desempenhem importantes funções durante e replicação viral *in vivo*.

Uma das respostas mais precoces contra infecções víricas é aquela mediada pelos interferons (IFNs) α e β , que agem de forma autócrina e parácrina, induzindo um estado de resistência antiviral nas células. Os IFNs atuam por meio de seu receptor, provocando a ativação da transcrição de genes cujos produtos possuem ações antivirais. Elementos-chave nesse mecanismo são as quinases citoplasmáticas denominadas STATs, que, uma vez ativadas, são translocadas para o núcleo, onde se ligam e ativam os promotores responsivos ao IFN. As proteínas E1A dos AdVs atuam diretamente nos mecanismos mediados pelos IFNs, ligando-se e inativando a STAT1 e, assim, bloqueando a ativação dos genes responsivos aos IFNs.

Em resumo, as proteínas iniciais dos AdVs atuam para assegurar uma expressão gênica adequada, progressão do ciclo celular e modulação das respostas do hospedeiro, até que o ciclo replicativo seja concluído. Indiretamente, essas atividades contribuem para a disseminação do vírus no organismo do hospedeiro. Estudos de infecções pelos AdVs *in vivo* têm demonstrado que esses vírus não são inerentemente inflamatórios, indicando que conseguem moderar a resposta inflamatória do hospedeiro.

4.4 Replicação do DNA viral

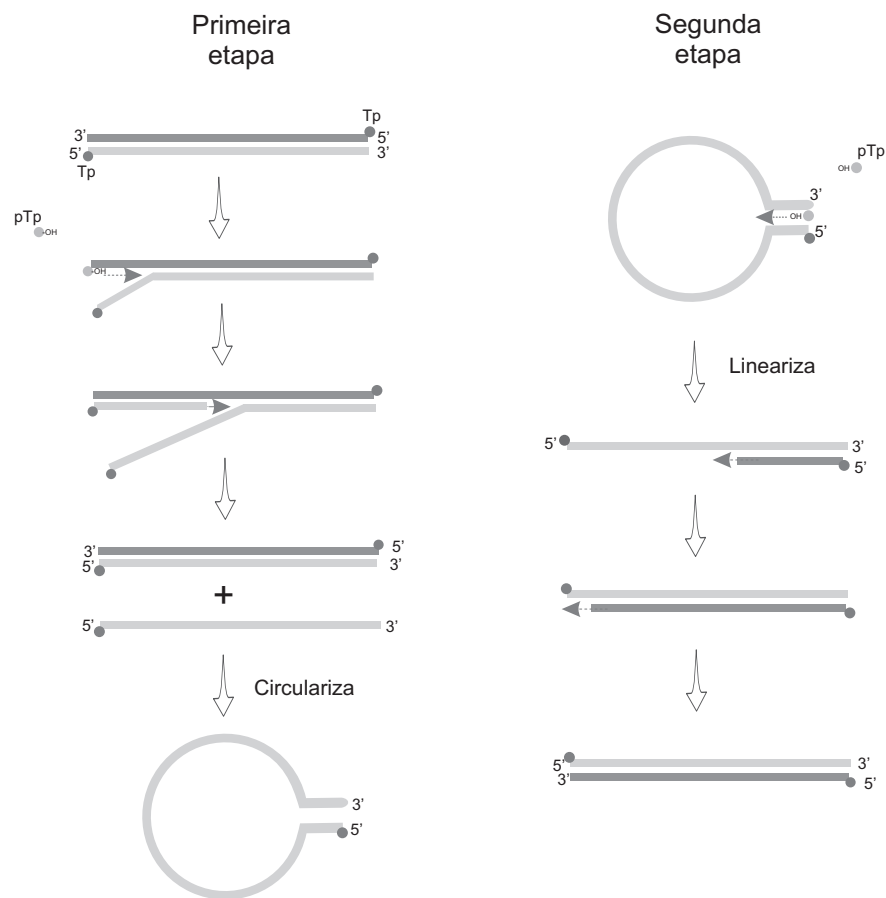
A maioria das funções necessárias para a replicação do DNA dos AdVs são codificadas pela região E2 do genoma. Sequências específicas de

51 bp, localizadas nas regiões terminais repetidas, servem de origem de replicação (*ori*). Duas proteínas virais codificadas pela região E2, a proteína pré-terminal (pTP) e a polimerase de DNA, se ligam nas primeiras 20 bases da *ori*. Uma terceira proteína da E2, a proteína ligante do DNA (DBP), juntamente com fatores celulares, ligam-se um pouco abaixo (na direção 3') e interagem com o complexo pTP/polimerase. A principal função da pTP é servir de *primer* para a iniciação da replicação do DNA viral. Essa proteína é, posteriormente, clivada para originar a TP, que permanece ligada às extremidades 5' do genoma. A DBP forma multímeros em uma das cadeias do DNA, provocando a separação das cadeias, evento que é necessário para a elongação das cadeias-filhas. A síntese de DNA se inicia na extremidade de uma das cadeias e se prolonga até a outra extremidade, resultando em uma molécula de cadeia dupla recém-replicada e uma molécula parental de cadeia simples. No segundo estágio, a cadeia simples deslocada na reação inicial serve de molde para a síntese da cadeia complementar. Em células de cultivo, a replicação do DNA viral se inicia 5 a 10 horas após a infecção e continua até a morte celular. Uma ilustração simplificada da replicação do genoma dos AdVs está apresentada na Figura 6.8. Maiores detalhes sobre este mecanismo estão apresentados no Capítulo 16.

4.5 Expressão dos genes tardios

O promotor principal tardio exibe um nível baixo de atividade durante as fases iniciais da infecção e direciona a expressão da proteína L1 52/55-kDa. Esta proteína se associa com o genoma e o empacota em etapas avançadas do ciclo. À medida que a replicação do DNA progride, a atividade do promotor tardio aumenta e se torna centenas de vezes mais ativo em fases tardias da infecção. Esse promotor é fortemente ativado pelas proteínas E1A, mas as razões de sua ativação tardia são desconhecidas.

A transcrição da região tardia do genoma resulta em um transcrito primário longo, que é processado por poliadenilação em diferentes sítios,



Fonte: adaptada de Flint et al. (2000).

Figura 6.8. Ilustração esquemática da replicação do genoma dos adenovírus. Na primeira etapa, apenas uma das cadeias é replicada de maneira contínua, a partir de uma das extremidades. A cadeia não-replicada circulariza então para a formação de uma nova origem de replicação. A replicação desta cadeia inicia na extremidade e prossegue ao longo da cadeia, que, em seguida, assume a topologia linear. Ao final das duas etapas, as duas cadeias de DNA estão replicadas.

e por *splicing* para gerar vários mRNA tardios. O acúmulo citoplasmático dos mRNA tardios é favorecido por duas proteínas virais, a E1B 55 kDa e E4 34 kDa, que facilitam o movimento desses transcritos do núcleo para o citoplasma. Concomitantemente, o transporte de mRNA celulares para o citoplasma é inibido. A natureza dessa discriminação (mRNA virais *versus* mRNA celulares) não é completamente conhecida, mas pode envolver a realocação de fatores celulares requeridos para o transporte de mRNA nos centros de transcrição virais.

Além disso, os mRNA virais são preferencialmente traduzidos em etapas tardias da infecção, por causa de vários mecanismos regulatórios

virais. Um desses mecanismos é a inativação do fator de iniciação da tradução eIF-4F, que, normalmente, se liga aos mRNA para facilitar a tradução. As extremidades 5' dos mRNA virais tardios contêm uma região não-codificante de 200 nt, que permite a esses mRNA serem traduzidos na ausência de eIF-4F ativo. Em contraste, os mRNA celulares não são mais traduzidos na ausência do eIF-4F.

A maioria das proteínas tardias dos AdVs são componentes estruturais dos vírions e fatores envolvidos na morfogênese que, juntamente com a replicação do DNA, produzem o cenário para a morfogênese e egresso da progênie viral.

4.6 Conclusões

Os adenovírus codificam uma série de produtos envolvidos na interferência com os mecanismos de regulação do ciclo celular. As proteínas E1A são ativadores promíscuos de vários genes virais e também induzem a célula a entrar em fase S. Por outro lado, os efeitos indiretos dessa ativação podem levar a célula infectada à apoptose. Por isso, os AdVs codificam também produtos com atividade antiapoptótica. Com isso, o vírus tem tempo suficiente para completar o seu ciclo replicativo. No hospedeiro, os AdVs interferem com o reconhecimento de células infectadas pelo sistema imunológico, também com o objetivo de preservar a integridade das células infectadas pelo tempo necessário para a conclusão do ciclo. Os AdVs têm sido intensivamente estudados como potenciais vetores para terapia genética e vacinas contra vírus.

5 Herpesvírus

Os herpesvírus (HVs) são vírus grandes (120-200 nm de diâmetro), com envelope, que possuem uma molécula de DNA de cadeia dupla linear como genoma. A família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias, de acordo com aspectos biológicos e moleculares em comum: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Todos os herpesvírus possuem a capacidade de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros. Os herpesvírus são encontrados em praticamente todas as espécies de vertebrados.

5.1 O ciclo replicativo

Os HVs replicam o seu genoma no núcleo da célula hospedeira e utilizam fatores virais e celulares no processo de replicação. Dependendo da expressão de determinados genes e das interações com a célula hospedeira, os HVs podem apresentar dois tipos distintos de ciclo replicativo. O primeiro ocorre nas células epiteliais ou do tegumento durante a infecção aguda inicial, logo após a penetração no hospedeiro. A infecção dessas células resulta na expressão do conjunto completo de genes virais e na produção de pro-

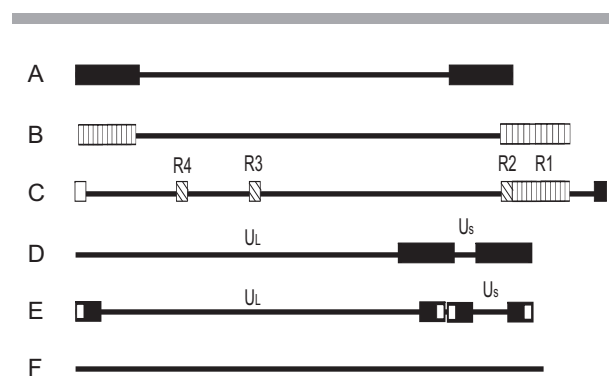
gênie viral infecciosa. A infecção produtiva com produção de progênie é incompatível com a sobrevivência das células e resulta inevitavelmente em lise. Esse ciclo lítico pode ser facilmente reproduzido *in vitro* pela inoculação de HVs em células de cultivo.

Após a replicação lítica inicial, os HVs podem permanecer em determinadas células do hospedeiro em um estado não-replicativo durante um longo período, provavelmente por toda a vida do indivíduo, sem que este apresente sinais da infecção. Essa forma não-produtiva de infecção, que ocorre sem a expressão de genes virais ou produção de progênie viral, é denominada infecção latente. No entanto, estímulos específicos – muitos deles relacionados ao estresse – podem induzir o vírus em latência a retomar a replicação ativa e, assim, iniciar um novo ciclo de infecção produtiva que culmina com a produção da progênie viral. Essa retomada da replicação ativa é denominada *reativação*. Grande parte dos conhecimentos sobre a replicação produtiva dos HVs foram obtidos a partir de estudos da replicação *in vitro* pelo herpesvírus humano tipo 1 (vírus do herpes simplex, HSV-1), que é o protótipo da família *Herpesviridae*. Em contraste, muito menos se conhece sobre a infecção latente pelos HVs pela dificuldade de sua reprodução *in vitro*.

5.2 O genoma dos HVs

O genoma dos herpesvírus consiste de uma fita dupla linear de DNA com 125 a 240 kb. Os genomas dos HVs são classificados em seis classes (A-F), com base na organização do genoma – presença, número e localização de regiões repetidas e terminais (Figura 6.9). Por exemplo, nos genomas da classe E (p. ex.: HSV-1), as seqüências terminais são repetidas em uma orientação invertida e justapostas internamente, dividindo o genoma em uma região curta (S) e outra longa (L), onde cada região é flanqueada por regiões repetidas e invertidas. O genoma do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um genoma do tipo D, no qual apenas a região curta (US) é flanqueada pelas regiões repetidas invertidas (Figura 6.9). Em ambos os casos, os componentes únicos podem estar na mesma orientação ou invertidos em relação ao

outro. O DNA extraído dos vírions consiste em populações equimolares que diferem apenas na orientação relativa dos dois componentes. Os genes presentes nas regiões repetidas obviamente se encontram em mais de uma cópia no genoma.



Fonte: adaptado de Roizman e Pellet (2001).

Figura 6.9. Estrutura e organização dos genomas dos herpesvírus. As linhas representam sequências únicas; os blocos representam sequências repetidas. Representantes de cada grupo: A) Herpesvírus do catfish de canal; B) Herpesvírus Saimiri; C) Vírus Epstein-Barr; D) Vírus da varicella-zoster; E) Vírus do herpes simplex; F) Herpesvírus Tupaia. Note que somente os genomas do tipo F não apresentam sequências repetidas. Os alfaherpesvírus de maior importância veterinária (herpesvírus bovino tipo 1 [BoHV-1] e vírus da doença de Aujeszky [PRV]) possuem genomas do tipo D.

O genoma dos HVs contém entre 70 e 200 genes, e a maioria destes são monocitrônicos, portanto, codificam apenas uma proteína. Os genes estão presentes e são transcritos a partir de ambas as cadeias de DNA. A expressão gênica é controlada por promotores com TATA box e a transcrição é realizada pela RNA polimerase II celular. Quando os genes são sobrepostos, as suas regiões regulatórias estão localizadas na região codificante do gene adjacente. Uma característica comum dos genomas dos HV é a existência de grupos de transcritos co-terminais da extremidade de 3', cada um expressando uma ORF diferente. Ao contrário dos adenovírus, a grande maioria dos transcritos dos HVs não sofrem *splicing*.

Alguns transcritos de genes dos HV parecem não conter ORFs traduzíveis. Um exemplo clássico é o transcrito associado com a latência (LAT) do HSV-1, que é o único RNA viral transcrito durante a latência desse vírus. No caso do vírus

Epstein-Barr (EBV), são sintetizados microRNAs que apresentam potencial para silenciar a expressão de genes celulares e/ou virais.

5.3 Os genes virais

Aproximadamente 30 genes dos HV (denominados centrais ou *core genes*) são conservados entre os membros da família *Herpesviridae*, ou seja, estão presentes nos genomas de todos os HV examinados até o momento. Os produtos desses genes são responsáveis pelo metabolismo dos nucleotídeos, pela replicação do DNA e pela morfogênese e estrutura dos vírions. Outros genes são conservados apenas entre membros de uma determinada subfamília. Por exemplo, os alfaherpesvírus codificam transcritos associados à latência, uma proteína do tegumento que ativa a transcrição dos genes iniciais e um regulador da transcrição relacionado ao ICP4 dos HSV-1. Além desses, vários outros genes são peculiares a algumas espécies de vírus.

Os HVs da subfamília *Gammaherpervirinae*, principalmente, codificam genes de origem do hospedeiro, provavelmente adquiridos por retrotransposição de cDNAs. Em alguns casos, os genes virais codificam funções similares as dos correspondentes celulares. Em outros casos, esses genes foram alterados para modificar a sua função. Por exemplo, o homólogo da ciclina tipo D (no herpesvírus humano tipo 8 [HHV-8]) não responde a sinais que atuam sobre a versão celular do gene, fazendo com que a ciclina tipo D viral permaneça constantemente ativada e capaz de promover transformação celular. Na seção 5.4, será visto que a aquisição de genes do hospedeiro é uma característica marcante dos poxvírus.

Cerca de 50% dos genes do HSV-1 não são necessários para a replicação viral em cultivo celulares, por isso são ditos não-essenciais (NE). No entanto, esses genes são importantes para a replicação e patogenicidade durante a infecção natural. Vários genes NE atuam antagonizando os mecanismos de defesa antiviral do hospedeiro e, assim, favorecendo a replicação do vírus.

Os HVs são capazes de alterar o ambiente celular para favorecer a sua replicação, provocando a inibição ou indução da síntese de macromo-

lécuas, indução ou inibição da síntese de DNA celular e, ainda, podem induzir a imortalização da célula hospedeira. Os HVs podem bloquear a indução de apoptose, ativar os mecanismos mediados pelo interferon e a apresentação de antígenos e mimetizar determinadas funções imunomodulatórias. Uma consequência geral dessas atividades é o retardamento na erradicação da infecção das células hospedeiras, por um período suficiente para permitir a replicação viral completa ou o estabelecimento da infecção latente.

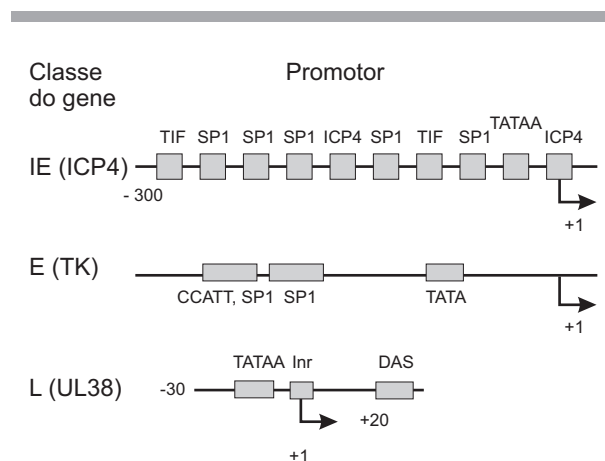
5.4 Expressão gênica

A cinética da expressão dos genes dos HVs durante a infecção aguda produtiva tem sido estudada detalhadamente em cultivo celular, mas acredita-se que variações possam ocorrer *in vivo* e também entre tipos celulares diferentes. Como na maioria dos vírus DNA, os genes dos HV são expressos sob regulação temporal estrita. Os genes alfa ou de transcrição imediata (IE) são os primeiros a serem expressos, seguidos pelos genes beta ou iniciais (E), gama 1 (parcialmente tardios) e pelos genes gama 2 ou tardios (L). Embora os genes virais sejam transcritos pela RNA polII celular com o auxílio de fatores celulares de transcrição, proteínas virais são necessárias e auxiliam em cada etapa de transcrição.

Após a penetração do vírus, o nucleocapsídeo envolto pelo tegumento é transportado para as proximidades dos poros nucleares, de onde o DNA viral é translocado para o interior do núcleo e rapidamente circularizado. No HSV-1, a proteína VP16 do tegumento liga-se a duas proteínas celulares, HGF e oct-1, formando um complexo que se liga especificamente aos promotores dos genes IE, ativando a sua transcrição. A ativação da transcrição é dependente da região C-terminal da VP16, que atua facilitando a reunião dos fatores de transcrição celulares responsáveis pela maquinaria de transcrição basal. A dependência da VP16 parece ser maior em células quiescentes e diferenciadas encontradas *in vivo*.

Seis produtos IE são codificados pelo HSV-1: os polipeptídeos ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e 47 e a proteína Us1.5. Os promotores desses genes geralmente são mais complexos do que os de ou-

tras classes de genes virais. Além do sítio para a ligação do complexo VP16/HCF/Oct-1, esses promotores contêm sítios específicos para a ligação de uma variedade de fatores de transcrição do hospedeiro (Figura 6.10).



Fonte: adaptado de Roizman e Knipe (2001).

Figura 6.10. Organização dos promotores dos genes de transcrição imediata (IE), iniciais (*early*) e tardios (*late*) do vírus do herpes simplex (HSV-1). Cada classe é representada pelo promotor de um determinado gene. Os retângulos indicam os sítios de ligação dos fatores de transcrição/transativadores. As setas indicam o início e direção da transcrição. IE: sítios para a ligação do complexo VP16/HCF/oct-1 (TIF), do fator de transcrição celular SP1 e do produto do gene ICP4; TATAA (TATA box). Inr: iniciador; DAS.

As proteínas IE ICP4, ICP27 e ICP22 regulam a expressão dos outros genes virais e, portanto, são indispensáveis para a continuação do ciclo replicativo. A deleção experimental do gene do ICP4, o mais importante transativador viral, resulta em um vírus incapaz de replicar. Outras funções dos genes IE incluem a inibição de *splicing* de mRNA (ICP27), a modulação do sistema de degradação das proteínas celulares (ICP0) e a redução da expressão das ciclinas indutoras da fase S (ICP22/Us1.5). A expressão das proteínas IE alcança o pico máximo em 2 a 4 horas após a infecção. Como o ICP4 é capaz de reprimir a sua própria expressão, acredita-se que contribua para a supressão dos genes IE, que é observada nas fases tardias da infecção.

As proteínas codificadas pelos genes E (beta) atingem o pico máximo de síntese cerca de 5 a 7 horas após a infecção, embora alguns produtos (p. ex.: a subunidade maior da ribonucleotídeo redutase, RR) sejam sintetizados com cinética semelhante aos genes IE. As proteínas E apresentam diferentes funções, relacionadas com o metabolismo de nucleotídeos e com a replicação do DNA viral. O seu acúmulo nas células infectadas prenuncia o início da replicação do DNA. Os produtos dos genes E envolvidos no metabolismo de nucleotídeos (timidina quinase TK, dUTPase, RR) e aqueles envolvidos na modificação e reparo do DNA (uracil-N-glicosilase e nuclease alcalina) não são essenciais para a replicação viral em células de cultivo. Isto se deve ao fato de as células em multiplicação expressarem enzimas próprias com atividades semelhantes. No entanto, as proteínas E são importantes *in vivo* e mutações nos seus genes resultam em vírus que apresentam replicação deficiente. Isso faz sentido principalmente nos alfa herpesvírus HSV-1 e BoHV-1, que são capazes de infectar diferentes tipos celulares, inclusive neurônios. Os neurônios são células diferenciadas que não se dividem e não expressam proteínas envolvidas no ciclo celular, incluindo várias proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e na replicação do DNA. Por isso, essas e outras proteínas virais podem ser cruciais para possibilitar a infecção de determinados tipos celulares.

A expressão dos genes gama 1 inicia em níveis baixos após o início da replicação do DNA, mas o seu nível de expressão aumenta com o avanço do processo replicativo. Os genes gama 2 (L) começam a ser expressos após a síntese e replicação do DNA viral. A transcrição dos genes tardios ocorre a partir de genomas recém-replicados, localizados em compartimentos de replicação nuclear, nos quais a ICP4 e a RNA polimerase II se localizam.

Os promotores dos genes tardios consistem de sequências regulatórias localizadas a certa distância dos genes, como também de sequências localizadas na região 5' não-traduzida (Figura 6.10). Além da ICP4, a transcrição dos genes tardios exige a presença da ICP27, uma proteína multifuncional que estimula a transcrição das proteí-

nas virais envolvidas na replicação do DNA viral. A ICP27 movimenta-se entre o núcleo e o citoplasma das células infectadas, com funções nos dois compartimentos. Evidências indicam que a ICP27 participa no recrutamento da enzima RNA polimerase II celular para a transcrição dos genes tardios; auxilia na exportação dos transcritos tardios para o citoplasma e estimula a tradução desses mRNA nos poliribossomos.

5.5 Replicação do DNA viral

No início da expressão dos genes iniciais, as proteínas UL9 (proteína viral que se liga na origem de replicação), UL29 (proteína que se liga em DNA de fita simples) e UL5, UL8 e UL52 (complexo helicase-primase) se dirigem ao núcleo e se associam ao DNA viral, formando estruturas focais chamadas de sítios pré-replicativos. Após o recrutamento do complexo viral de replicação de DNA (UL30/UL42), uma fração dos sítios pré-replicativos maturam para formar os compartimentos virais de replicação.

As funções mais importantes da proteína UL9 são a de ligação específica na origem de replicação (*ori*) e a separação das cadeias de DNA neste sítio. Acredita-se que isso favoreça a montagem do complexo de iniciação, incluindo a associação da DNA polimerase viral. A síntese da cadeia contínua envolve a separação das cadeias do DNA e a síntese de um *primer* pelo complexo helicase-primase, a partir do qual a cadeia nascente pode ser sintetizada de forma contínua pela DNA polimerase. A síntese da cadeia descontínua é mais complexa e envolve múltiplos ciclos de síntese do *primer*, extensão, remoção dos *primers* e ligação dos fragmentos de Okazaki adjacentes. A síntese de DNA viral ocorre pelo mecanismo de círculo rolante (*rolling circle*), que resulta em moléculas longas, contendo várias unidades do genoma unidas linearmente entre si. Essas moléculas contêm as quatro possíveis formas isoméricas do genoma (no caso do HSV-1), que são, então, clivadas em unidades genômicas, que são encapsidadas nos nucleocapsídeos (Figura 6.1).

Os fatores celulares induzidos na fase inicial da infecção, incluindo vários componentes da maquinaria de reparo do DNA, acumulam-se nos

centros de replicação viral. Esses fatores parecem ser importantes para os centros de replicação do HSV-1 se tornarem funcionais, sugerindo que um estresse celular pode ser necessário para a replicação eficiente dos HVs.

5.6 Expressão gênica durante a infecção latente

A expressão de genes virais durante a infecção latente é muito restrita e apenas um ou poucos genes virais são transcritos. Por exemplo, durante a latência em neurônios de gânglios sensoriais, o HSV-1 e o BoHV-1 sintetizam uma série de transcritos a partir de uma região bem determinada do genoma (região associada à latência, LRT; transcrito associado à latência, LAT). As demais regiões do genoma permanecem inativas em relação à transcrição. A razão dessa restrição da transcrição é desconhecida, mas o ambiente neuronal e sinais derivados de células do sistema imunológico têm sido implicados. Vírus recombinantes que possuem mutações na região do LAT/LRT são capazes de estabelecerem infecções latentes, mas são defectivos na reativação, o que sugere um papel para esses transcritos na reativação da infecção.

5.7 Conclusões

Os herpesvírus possuem um genoma mais complexo e codificam várias proteínas envolvidas nos processos replicativos. Com isso, esses vírus são capazes de replicar em uma variedade de células, independente do seu estado de divisão ou diferenciação. Ao contrário do que ocorre com os vírus DNA pequenos (polioma, papiloma e adeno), os HV não necessitam induzir as células a entrarem na fase S, pois codificam e/ou trazem nos vírions grande parte dos fatores necessários à replicação de seu genoma. No entanto, dependem da maquinaria celular de transcrição e processamento dos mRNAs. A replicação dos HVs geralmente induz uma supressão da síntese de macromoléculas das células, geralmente levando a alterações metabólicas incompatíveis com a vida celular. O estabelecimento de infecção latente se constitui em uma estratégia muito eficiente para

permitir a permanência do vírus no hospedeiro. A reativação ocasional dessas infecções permite ao vírus ser transmitido e infectar novos hospedeiros, perpetuando-se, assim, na natureza.

6 Poxvírus

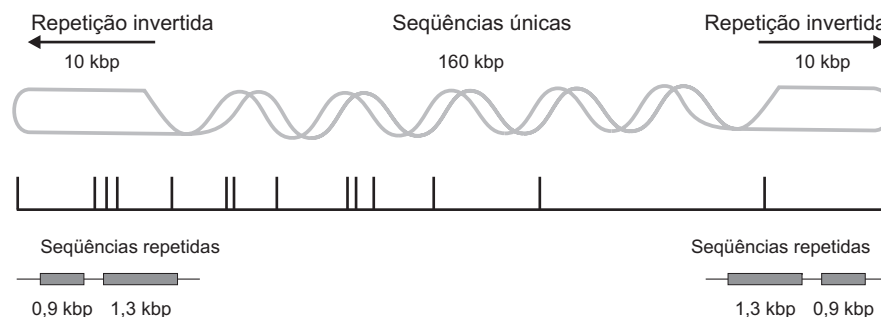
6.1 O ciclo replicativo

Os poxvírus (PoxV) são vírus DNA que realizam o seu ciclo replicativo – incluindo a replicação do genoma – integralmente no citoplasma, uma propriedade que é comum também ao vírus da peste suína africana (ASFV), único membro da família *Asfarviridae*. Como as enzimas celulares que participam da síntese de RNA e DNA estão localizadas no núcleo, os PoxV devem trazer nos vírions as suas próprias enzimas e fatores auxiliares. Esse cenário ilustra o nível de independência relativa que esses vírus conseguiram atingir em relação à célula hospedeira. No entanto, embora codifiquem grande parte das enzimas e fatores de transcrição, os PoxV ainda são dependentes de vários fatores auxiliares da célula hospedeira. O ciclo replicativo dos PoxV foi estudado *in vitro*, utilizando-se o vírus da *vaccinia* (VV) como modelo. Apesar da sua complexidade, o ciclo replicativo do VV é relativamente rápido, e a progênie viral pode ser detectada já oito horas pós-infecção (pi).

6.2 O genoma dos PoxVs

Mais de 50 seqüências genômicas completas, representando vários gêneros, espécies e isolados de campo dos PoxV já foram obtidas, permitindo uma descrição detalhada da estrutura, organização genômica e dos genes individuais.

O genoma dos PoxV consiste de uma molécula de DNA linear de fita dupla com 130-390 kbp, contendo seqüências repetidas invertidas do tipo *hairpin* (ITRs) de 0.1 a 12.4 kb nas extremidades (Figura 6.11). Nos *Chordopoxvirus* (ChPVs), o número de genes é de aproximadamente 150, embora mais de 300 genes já tenham sido deduzidos no genoma do PoxV do canário (canaripox). A densidade gênica é alta, com uma média de um gene por kb.



Fonte: adaptado de Murphy et al. (1999).

Figura 6.11. Estrutura do genoma dos poxvírus. O genoma consiste de uma molécula contínua de DNA de fita dupla, sem extremidades livres. Nas duas extremidades, situam-se regiões repetidas invertidas de aproximadamente 10 kb cada. As seqüências únicas abrangem o restante do genoma.

Aproximadamente 90 dos 150 genes são conservados no genoma de todos os ChPVs seqüenciados até o presente, e codificam produtos que participam da replicação do DNA, da transcrição, da morfogênese e da estrutura das partículas virais. Nesses genes, tanto as regiões codificantes quanto os promotores são altamente conservados. Em geral, grande parte dos genes conservados estão localizados na região central do genoma.

Os genes localizados entre a região central e as extremidades do genoma tendem a ser espécie-específicos e codificam proteínas cujas funções antagonizam a resposta imune do hospedeiro. Esses genes são chamados coletivamente de genes de virulência. Estão incluídos nesse grupo os genes que codificam produtos homólogos às citocinas e quimioquinas do hospedeiro, e genes de receptores de citocinas e quimioquinas que foram adquiridos do hospedeiro e modificados durante a evolução. Ao contrário dos genes centrais conservados, vários genes de virulência são dispensáveis para a replicação viral em cultivo celular.

6.3 Expressão gênica

Como os outros vírus DNA, os PoxVs coordenam os processos de replicação genômica e morfogênese por meio de uma regulação temporal da expressão de grupos de genes. A transcri-

ção dos genes do VV pode ser dividida em três etapas: inicial, intermediária e tardia. A transcrição de vários genes, no entanto, parece não obedecer a essa regulação estrita, ocorrendo continuamente ao longo do ciclo replicativo.

Os fatores de transcrição e enzimas necessárias para a transcrição dos genes iniciais estão presentes nas partículas víricas infectantes. Assim, a transcrição desses genes inicia poucos minutos após a penetração viral, ainda no interior de partículas parcialmente íntegras e, portanto, antes do desnudamento ser completado. A transcrição inicial resulta na produção de aproximadamente 100 mRNA diferentes, que são exportados do interior dos vírions para o citoplasma para serem traduzidos. Entre as proteínas dos genes iniciais estão aquelas envolvidas nos mecanismos de evasão do sistema imunológico, no desnudamento completo do genoma, na síntese de DNA viral e na regulação da expressão dos genes intermediários.

Os produtos dos genes intermediários são principalmente fatores de transcrição utilizados para a expressão dos genes tardios. As proteínas tardias, por sua vez, estão envolvidas na morfogênese, fazem parte da estrutura das partículas víricas e também incluem as enzimas e fatores de transcrição que serão incluídos na progênie viral para o próximo ciclo de replicação.

Os genes dos PoxVs são transcritos pela RNA polimerase viral, que é composta por nove

subunidades. As duas subunidades maiores apresentam um alto grau de similaridade nos aminoácidos, com as subunidades maiores das RNA polimerases de eucariotas e procariotas, mas as duas subunidades menores não apresentam similaridade significativa com as suas correspondentes.

Aproximadamente a metade dos genes do VV pertence ao grupo dos genes iniciais. Os promotores desses genes possuem um resíduo de guanina (G) extremamente conservado na posição -21, flanqueado por uma região variável rica em A-T. A transcrição dos genes iniciais requer a RNA polimerase viral, o fator de transcrição inicial (ou ETF, a única proteína de ligação ao DNA codificada pelos PoxV) e ATP. No modelo atual, o ETF se liga nos promotores iniciais e recruta o complexo da RNA polimerase. A hidrólise de ATP pelo ETF e a sua subsequente liberação do complexo permite a RNA polimerase iniciar a transcrição.

Estudos recentes sugerem que vários fatores de transcrição dos genes iniciais formam complexos que se ligam aos promotores durante a morfogênese das partículas virais. Com isso, parte dos fatores necessários para a transcrição inicial já estaria posicionada nos promotores, permitindo o rápido início da transcrição, logo após a penetração na célula hospedeira. As enzimas virais guanilyl-transferase (*capping enzyme*), polimerase poly-A e um fator de terminação da transcrição também são importantes para a transcrição inicial. A transcrição desses genes termina logo após o final das ORFs, em resposta a uma sequência TTTTNT (onde N é qualquer nucleotídeo), localizada na cadeia de DNA oposta (codificante). Até o presente, nenhuma função da célula hospedeira foi identificada como necessária para a iniciação e terminação da transcrição inicial.

Após o desnudamento completo do genoma, seguem-se as etapas de transcrição dos genes intermediários, a replicação do DNA e a transcrição dos genes tardios. Os promotores dos genes intermediários são bipartidos, possuindo um elemento iniciador no sítio de iniciação da transcrição e uma sequência rica em A-T, localizada próxima (na direção 5'). A transcrição desses genes requer fatores virais recém-sintetizados, como a

RNA polimerase, fatores ITF-A (helicase), ITF-B (enzima que coloca o *cap*), VITF-2 (fator derivado do hospedeiro) e B1R (proteína quinase viral).

Os promotores dos genes tardios também são bipartidos e contêm um elemento iniciador e uma região rica em A-T logo acima. Além da RNA polimerase, três produtos de genes intermediários e um produto inicial são necessários para a transcrição dos genes tardios, embora as funções desses produtos sejam desconhecidas. Um fator de transcrição do hospedeiro também parece estar envolvido na transcrição dos genes tardios. A terminação da transcrição dos genes tardios é diferente daquela dos genes iniciais, mas também requer a participação de produtos virais.

6.4 Replicação do DNA

A replicação citoplasmática do genoma se constitui em um aspecto único do ciclo replicativo dos PoxV e ASFV. A replicação do DNA do VV ocorre em “fábricas virais”, que são áreas citoplasmáticas totalmente envolvidas por membranas derivadas do retículo endoplasmático rugoso (RER). O envolvimento dessas áreas pelas membranas do RER é um processo que se completa em, aproximadamente, 45 minutos a partir do início da infecção e parece ser influenciado por proteínas virais de membrana. Em etapas tardias da infecção, quando se inicia a morfogênese, esses “envelopes” membranosos do RER não são mais visíveis na estrutura celular.

Alguns PoxVs codificam enzimas envolvidas na síntese de deoxiribonucleotídeos (dNTPs), para favorecer a síntese e replicação do DNA em células que na estão em divisão. No caso do VV, a replicação do DNA ocorre entre 3 e 12 horas pós-infecção e resulta na produção de aproximadamente 10.000 cópias por célula, metade das quais serão incluídas nos vírions.

Acredita-se que a replicação do DNA dos PoxV se inicie com uma clivagem em uma das cadeias nas proximidades dos *hairpins*, seguida de polimerização sequencial a partir da extremidade 3', deslocamento da cadeia complementar e resolução por concatêmeros (Figura 6.1). A região terminal de 200 pb do genoma provavelmente serve

de origem de replicação. A resolução/separação dos genomas individuais requer uma proteína viral tardia, a *resolvase*. Partículas víricas imaturas, em associação com estruturas membranosas, acabam envolvendo o DNA e amadurecem na forma de vírions de formato retangular.

Vários produtos virais desempenham funções importantes da replicação do genoma do VV, incluindo a polimerase de DNA e um fator de processividade associado; a trifosfatase de nucleosídeos, a proteína de ligação em DNA de fita simples, a topoisomerase I, proteína quinase e glicosilase de uracil. Mutações em qualquer desses genes são deletérias para a capacidade dos vírus replicar o seu genoma.

6.5 Conclusões

Os PoxVs estão entre os vírus mais complexos de animais e trazem nos vírions e/ou codificam um número grande de enzimas e fatores necessários à transcrição, processamento de seus mRNAs e replicação do genoma. Por isso, independem da maquinaria celular de síntese de RNA e DNA e realizam o ciclo replicativo inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. Os PoxVs também codificam uma série de produtos que antagonizam a resposta imunológica do hospedeiro, permitindo, assim, que o ciclo replicativo seja completado com a mínima interferência dos mecanismos anti-virais. A facilidade da manipulação do genoma, assim como a sua extensão e capacidade de suportar a inserção de grandes segmentos de DNA, têm feito dos PoxV vírus adequados para a construção de vetores vacinais.

7 Bibliografia consultada

- ACKERMANN, H.-W.; BERTHIAUME, L.; TREMBLAY, M. **Virus Life in Diagrams**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998. 221p.
- BEAUD, G. Vaccinia virus DNA replication: a short review. **Biochimie**, v.77, p.774-779, 1995.
- BLASCO, R. et al. Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. **Virology**, v.168, p.330-338, 1989.
- BOEHMER, P.E.; LEHMAN, I.R. Herpes simplex virus DNA replication. **Annual Review of Biochemistry**, v.66, p.347-384, 1997.
- CAMPO, M.S. Cell transformation by animal papillomaviruses. **The Journal of General Virology**, v.73, p.217-222, 1992.
- CAMPO, M.S. Review: bovine papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, v.154, p.175-188, 1997.
- CANN, A.J. **Principles of Molecular Virology**. 2.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1997. 310p.
- CHOW, L.T.; BROKER, T.R. Small DNA tumor viruses. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.12, p.267-301.
- COLE, C.N.; CONZEN, S.D. Polyomaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.63, p.2141-2174.
- DiMAIO, D.; COEN, D.M. Replication strategies of DNA viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.6, p.119-132.
- DULBECCO, R.; GINSBERG, H.S. Multiplication and genetics of animal viruses. In: DAVIS, B.D. et al. (Eds). **Microbiology**. 3.ed. Hagerstown, MD: Harper & Row, 1980. 967p.
- FAUQUET, C.M. et al. (Eds). **Virus taxonomy**, REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE OF TAXONOMY OF VIRUSES, 8. 2.ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. 1162p.
- FLINT, S.J. et al. **Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. 804p.
- GAUKROGER, J.M. et al. Interaction between bovine papillomavirus type 4 and cocarcinogens in the production of malignant tumours. **The Journal of General Virology**, v.74, p.2275-2280, 1993.
- HAY, R.T. et al. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.199, p.31-48, 1995.
- HOWLEY, P.M.; LOWY, D.R. Papillomaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.65, p.2197-2229.
- HUNTER, E. Virus assembly. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.8, p.171-197.
- MANKERTS, A. et al. Molecular biology of porcine circovirus: analysis of gene expression and viral replication. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.81-84, 2004.
- MOSS, B. Poxviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.84, p.2849-2883.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.

PLOUBIDOU, A.; WAY, M. Viral transport and the cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, p.97-105, 2001.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.72, p.2399-2459.

ROIZMAN, B.; PALESE, P. Multiplication of viruses: an overview. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.4, p.101-111.

ROIZMAN, B.; PELLETT, P.E. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.71, p.2381-2397.

SHENK, T.E. Adenoviridae: the viruses and their replication.. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.67, p.2265-2300.

TAVIS, J.E. The replication strategy of the hepadnaviruses. **Viral Hepatitis Review**, v.2, p.205-218, 1996.

WHITE, D.O.; FENNER, F. **Medical virology**. 4.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1994. 610p.

REPLICAÇÃO DOS VÍRUS RNA

Maria Elisa Piccone¹ & Eduardo Furtado Flores

7

1 Introdução	167
1.1 Diversidade de estrutura, organização e funcionalidade dos genomas	167
1.2 Sítios de replicação	169
1.3 Infidelidade das replicases e diversidade genética	169
1.4 Outras proteínas virais envolvidas na replicação	169
2 Vírus com genoma RNA de sentido positivo	169
2.1 Genomas com uma única ORF, sem produção de mRNA subgenômicos	171
2.1.1 Estrutura e organização do genoma	171
2.1.2 Tradução e replicação do genoma	172
2.2 Genomas com mais de uma ORF e produção de mRNAs subgenômicos	174
2.2.1 Estrutura e organização genômica	174
2.2.2 Expressão gênica e replicação do genoma	174
3 Vírus com genoma RNA de sentido negativo	176
3.1 Vírus com o genoma não-segmentado	176
3.1.1 Estrutura e organização do genoma	177
3.1.2 Transcrição	178
3.1.3 Replicação do genoma	179
3.2 Vírus com o genoma segmentado	180
3.3 Vírus com o genoma <i>ambissense</i>	181
4 Vírus com RNA de fita dupla	182
4.1 Estrutura e organização do genoma	182
4.2 Transcrição	183
4.3 Replicação do genoma	184
5 Retrovírus	184
6 Bibliografia consultada	185

¹ Responsável pela seção de vírus RNA de sentido positivo.

1 Introdução

Os vírus RNA compõem um grupo amplo e diverso de vírus que infectam desde insetos e plantas até vertebrados superiores. São os únicos organismos que possuem RNA como genoma, e, por isso, precisaram se adaptar a certas condições impostas pelas células hospedeiras para poder se multiplicar. As células eucariotas não possuem enzimas e reações para a síntese de RNA a partir de moldes RNA, etapa necessária para a replicação do genoma desses vírus. No entanto, a evolução viral solucionou este impasse, pois o genoma de um vírus RNA codifica a sua própria enzima replicativa (RNA polimerase dependente de RNA ou replicase). Em alguns vírus RNA, a replicase e os fatores auxiliares para a replicação do genoma são produzidos pela tradução direta do genoma, logo no início do ciclo replicativo. Em outros vírus RNA, o genoma não é traduzido diretamente e os vírions carregam a enzima replicase e os fatores necessários para a replicação do genoma.

A replicação do genoma dos vírus RNA (com exceção dos retrovírus) ocorre em duas etapas e envolve a síntese de moléculas intermediárias (RNA complementar ou antígenômico). O RNA antígenômico serve, então, de molde para a síntese de RNA de sentido genômico. A síntese de RNA com sentido de mensageiro (mRNA ou sentido positivo) denomina-se transcrição, e a síntese de RNA genômico denomina-se replicação. Na verdade, transcrição e replicação são termos equivalentes utilizados para designar a síntese de moléculas de RNA a partir de moldes. A mesma enzima replicase, possivelmente assistida por uma combinação diferente de fatores auxiliares ou submetida a modificações químicas, é responsável tanto pela transcrição como pela replicação. O complexo enzimático envolvido na transcrição é geralmente chamado de *transcriptase*; e o complexo responsável pela replicação é denominado *replicase*.

Os retrovírus apresentam uma estratégia de replicação única, que difere dos demais vírus RNA. Esses vírus possuem um genoma RNA com sentido positivo, mas que não é traduzido diretamente. A replicação do genoma ocorre pela

produção de uma molécula de DNA complementar (provírus) que é integrada aos cromossomos celulares. A transcrição desse provírus pela RNA polimerase II celular (RNAPol II) resulta na produção do RNA para ser incluído como genoma nas partículas víricas.

A natureza do seu genoma resultou em algumas consequências biológicas e evolutivas para os vírus RNA: a) a maioria deles realiza o seu ciclo replicativo inteiramente no citoplasma das células hospedeiras, b) poucos deles utilizam o processamento de RNA (*splicing*) para a geração de diversidade de proteínas; c) a alta taxa de erro das replicases virais, associada com a ausência de autocorreção, resulta em uma alta frequência de mutações, o que contribui para a grande variabilidade genética e antigênica desses vírus.

1.1 Diversidade de estrutura, organização e funcionalidade dos genomas

Os genomas dos vírus RNA de animais são todos compostos por moléculas lineares, porém, apresentam diferenças quanto à funcionalidade, estrutura e organização (Tabela 7.1). A distinção inicial se refere à funcionalidade do genoma, ou seja, existem vírus com genoma RNA de sentido (ou polaridade) positivo e negativo. Os vírus RNA de sentido positivo possuem as seqüências codificantes de proteínas (*open reading frames*, ORFs) no mesmo sentido do genoma, ou seja, o seu genoma pode ser diretamente traduzido em proteínas pelos ribossomos. Dentre estes, duas propriedades principais são reconhecidas: alguns vírus possuem uma única ORF no genoma e outros genomas possuem mais de uma ORF e produzem RNAs mensageiros subgenômicos (mRNAsg).

Os RNAs genômicos dos vírus RNA de sentido negativo não apresentam as ORFs na mesma orientação do genoma, assim, não podem ser diretamente traduzidos em proteínas. As ORFs estão presentes no RNA complementar, de sentido antígenômico. Então, a produção de suas proteínas depende inicialmente da síntese de mRNAs pela polimerase viral trazida nos vírions. Dentre esses vírus, existem alguns cujo genoma é composto por uma molécula contínua de RNA

e outros cujo genoma é dividido em dois ou mais segmentos. Dentre os vírus com o genoma segmentado, existem alguns que possuem o genoma *ambissense*, ou seja, codificam as suas proteínas por ORFs existentes tanto no RNA de sentido genômico quanto no RNA complementar.

Todos os genomas dos vírus RNA (sentido positivo e negativo, segmentados ou não) são compostos por moléculas de RNA de fita simples (ssRNA). Um terceiro grupo é formado por vírus que possuem fita de RNA de cadeia dupla (dsRNA) segmentada como genoma. Estes vírus também trazem a enzima polimerase nos vírions, que é necessária para a transcrição e replicação dos segmentos genômicos.

Os retrovírus representam uma exceção entre os vírus RNA. O seu genoma possui polaridade positiva, porém não é traduzido diretamente pelos ribossomos. A replicação dos retrovírus envolve a transcrição reversa (síntese de DNA a partir de RNA), integração do DNA proviral nos cromossomos da célula hospedeira e transcrição do provírus pelo aparato celular de transcrição.

Apesar dessa diversidade, praticamente todos esses vírus convergem para um evento central comum: a produção de mRNA reconhecíveis e traduzíveis pela maquinaria celular de tradução. A única exceção é composta pelos genes que codificam proteínas não-estruturais (e estruturais em alguns casos) entre os vírus RNA de sentido positivo, que podem ser traduzidos diretamente do genoma.

Tabela 7.1. Classificação dos vírus RNA de acordo com a estrutura, organização e polaridade do genoma e local intracelular de replicação

Família	RNA genômico				Replicação
	ss/ds	Polaridade	Topologia	Segmentos	Local intracelular
<i>Picornaviridae</i>	ss	Positiva	Linear	1	Citoplasma
<i>Flaviviridae</i>	ss	Positiva	Linear	1	Citoplasma
<i>Caliciviridae</i>	ss	Positiva	Linear	1	Citoplasma
<i>Astroviridae</i>	ss	Positiva	Linear	1	Citoplasma
<i>Togaviridae</i>	ss	Positiva	Linear	1	Citoplasma
<i>Coronaviridae</i>	ss	Positiva	Linear	1	Citoplasma
<i>Arteriviridae</i>	ss	Positiva	Linear	1	Citoplasma
<i>Retroviridae</i>	ss	Positiva	Linear	2 (idênticos)	Núcleo/citoplasma
<i>Bimaviridae</i>	ds	Ambas	Linear	2	Citoplasma
<i>Reoviridae</i>	ds	Ambas	Linear	10-12	Citoplasma
<i>Rhabdoviridae</i>	ss	Negativa	Linear	1	Citoplasma
<i>Filoviridae</i>	ss	Negativa	Linear	1	Citoplasma
<i>Bornaviridae</i>	ss	Negativa	Linear	1	Núcleo
<i>Paramyxoviridae</i>	ss	Negativa	Linear	1	Citoplasma
<i>Orthomyxoviridae</i>	ss	Negativa	Linear	7-8	Núcleo
<i>Bunyaviridae</i>	ss	Negativa ou ambissense	Linear	3	Citoplasma
<i>Arenaviridae</i>	ss	Ambissense	Linear	2	Citoplasma

1.2 Sítios de replicação

Com exceção dos vírus das famílias *Orthomyxoviridae* e *Bornaviridae*, cuja replicação do genoma ocorre no núcleo; e dos retrovírus, em que o ciclo replicativo ocorre parte no citoplasma e parte no núcleo, os demais vírus RNA realizam o seu ciclo replicativo inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. Esses vírus são, portanto, independentes da maquinaria nuclear de síntese e processamento de RNAs. Os ortomixovírus replicam o genoma no núcleo e são dependentes de oligonucleotídeos com *cap*, que são subtraídos dos mRNA celulares. Estes vírus, além dos retrovírus, dependem ainda da maquinaria de processamento de mRNAs celulares (*splicing*) para o processamento de alguns de seus transcritos. Alguns vírus RNA que replicam no citoplasma (paramixovírus) utilizam mecanismos alternativos para modificar os seus transcritos e produzir diferentes proteínas a partir de um mesmo gene.

1.3 Infidelidade das replicases e diversidade genética

As replicases dos vírus RNA (RNAs polimerases dependentes de RNA) apresentam uma taxa de erro aproximadamente 1.000 a 10.000 vezes superior às polimerases de DNA. Além disso, essas enzimas não possuem a atividade de *proofreading* (correção de nucleotídeos incorretos adicionados durante a síntese). O resultado disso é que pelo menos uma mutação em ponto pode ser introduzida a cada replicação do genoma, o que tem uma grande implicação para a diversidade e evolução desses vírus. Como consequência, uma população de vírus RNA não é constituída por uma progênie clonal homogênea, e sim por uma mistura de variantes agrupados em torno de uma sequência predominante e mais abundante. Essa população heterogênea de vírus que compõe uma espécie viral é denominada *quasi-species*. A geração contínua dessa população heterogênea se constitui em uma grande vantagem evolutiva para os vírus RNA, pois permite que variantes geradas ao acaso possam apresentar vantagem evolutiva e rapidamente se sobressair na população quando submetidos à determinada pressão de seleção. A rápida taxa de evolução desses ví-

rus possui implicações importantes na epidemiologia, patogenicidade, diagnóstico e para a produção de vacinas.

1.4 Outras proteínas virais envolvidas na replicação

Além das replicases, outras proteínas que participam da síntese de RNA são codificadas por esses vírus. As funções exercidas por essas proteínas são diversas e incluem: a) direcionamento da polimerase e/ou do genoma aos locais da célula onde ocorre a replicação; b) facilitação do reconhecimento do sítio de iniciação da síntese de RNA pela polimerase; c) encapsidação do genoma RNA para a transcrição e replicação; d) aumento da afinidade da polimerase pelo RNA; e) aumento da atividade da polimerase; f) separação das cadeias de RNA para a polimerização (atividade de helicase); g) alteração da especificidade da polimerase pelo molde RNA (troca de transcrição para replicação). Ou seja, esses vírus codificam uma série de proteínas, algumas com atividades enzimáticas, que atuam como co-fatores no processo de síntese de RNA e replicação do genoma.

Além de proteínas, a síntese de RNAs virais envolve a participação de componentes celulares, denominados genericamente fatores do hospedeiro. A especificidade, as etapas de participação e a dependência relativa de fatores do hospedeiro para a síntese de RNA viral variam entre os vírus.

2 Vírus com genoma RNA de sentido positivo

Por definição, esses vírus codificam as suas proteínas no sentido do RNA genômico, ou seja, as sequências abertas de leitura (ORFs) que codificam as proteínas virais estão presentes na mesma orientação do genoma. Por isso, o RNA genômico pode ser usado como mRNA e ser diretamente traduzido pelos ribossomos. Os vírus desse grupo possuem algumas características em comum: a) replicam no citoplasma da célula hospedeira; b) o RNA genômico serve de mRNA e pode ser traduzido; c) o RNA genômico desprovido de proteínas é infeccioso quando introduzido

nas células; d) as proteínas virais são sintetizadas como poliproteínas precursoras. Essas poliproteínas são imediatamente clivadas em proteínas individuais por proteases virais e/ou celulares; e) os vírions não contêm enzimas.

As infecções por vírus RNA de sentido positivo não são exclusivas dos animais, e um grande número desses agentes pode infectar também bactérias ou plantas, constituindo gêneros que são classificados dentro dessas famílias de vírus.

Sete famílias de vírus animais possuem genoma RNA de sentido positivo, e todos possuem

o genoma não-segmentado: 1) *Picornaviridae*, 2) *Flaviviridae*, 3) *Caliciviridae*, 4) *Astroviridae*, 5) *Togaviridae*, 6) *Arteriviridae* e 7) *Coronaviridae*.

A replicação do genoma desses vírus envolve a ação conjunta de vários componentes, que incluem proteínas virais, seqüências específicas no RNA viral e, provavelmente, vários componentes celulares, como proteínas e membranas.

Uma diferença fundamental entre grupos de vírus RNA de sentido positivo se refere à existência de uma ou mais ORFs no genoma e a produção ou não de mRNAs subgenômicos (Figura 7.1; Tabela 7.2).

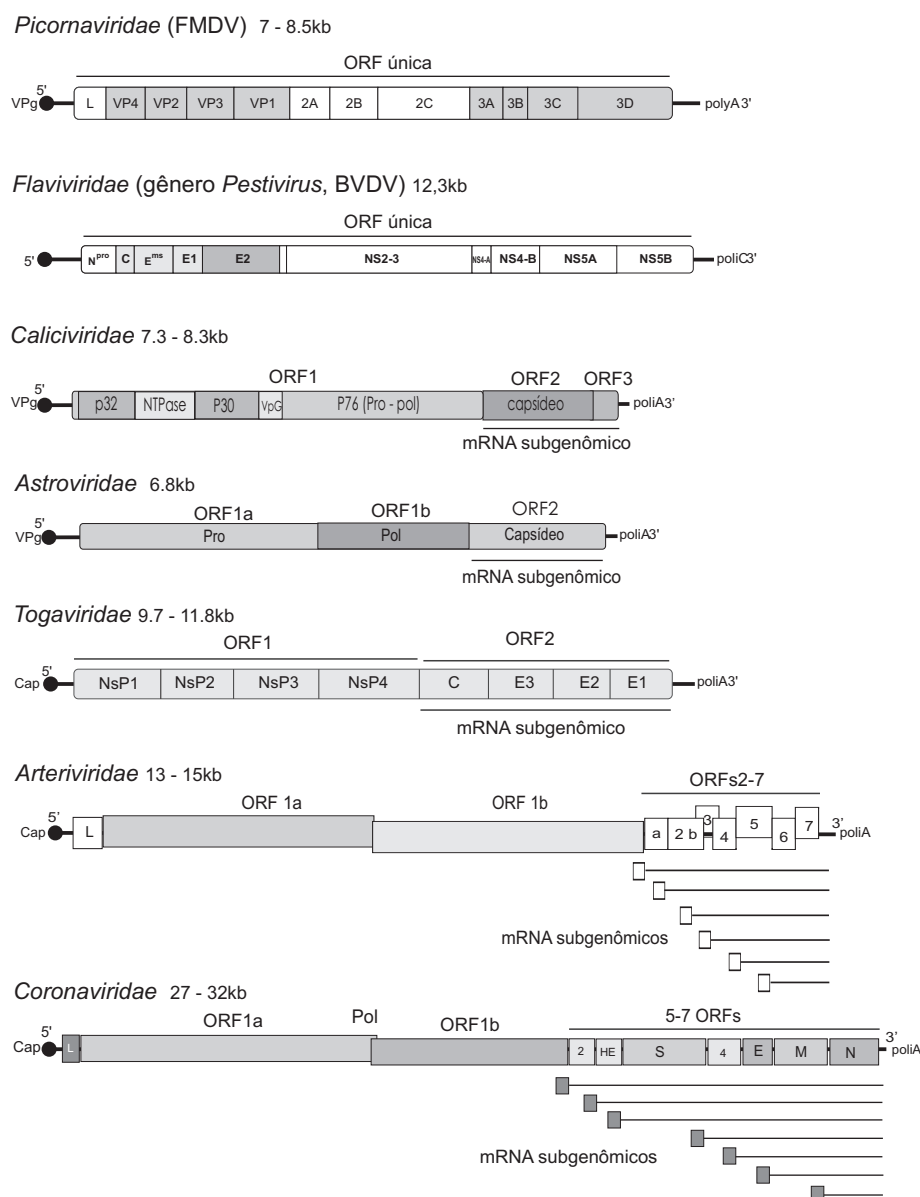


Figura 7.1. Estrutura e organização do genoma dos vírus RNA de sentido positivo. As linhas contínuas representam o RNA genômico; os retângulos representam os genes. A localização das ORFs e dos mRNA subgenômicos também está indicada.

Tabela 7.2. Principais características do genoma dos vírus RNA de polaridade positiva

Família	Genoma (kb)			RNA subgenômicos
	Extensão (kb)	5' Extremidades	3'	
<i>Picornaviridae</i>	7,2 - 8,5	VPG*, IRES	poliA	não
<i>Flaviviridae</i>	9,6 - 12,3	cap**, IRES***	poliC****	não
<i>Astroviridae</i>	6,8	VPG	poliA	sim (1)
<i>Caliciviridae</i>	7,3 - 8,3	VPG	poliA	sim (1)
<i>Arteriviridae</i>	13 - 15	cap	poliA	sim (6)
<i>Togaviridae</i>	9,7 - 11,8	cap	poliA	sim (1)
<i>Coronaviridae</i>	27 - 32	cap	poliA	sim (5-7)

* Proteína terminal associada à extremidade 5' do genoma.
 ** Apenas os vírus do gênero *Flavivirus*.
 *** Pestivirus, hepacivírus.
 **** Pestivirus (BVDV).

Nos vírus que possuem uma única ORF no genoma, todas as proteínas são produzidas pela tradução direta do RNA genômico, originando uma longa poliproteína. Esta poliproteína é clivada por proteases celulares e/ou virais, originando as proteínas individuais. A clivagem ocorre à medida que a tradução vai se desenvolvendo, de modo que a poliproteína inteira nunca é detectada nas células infectadas. Nesses vírus, os genes que codificam as proteínas estruturais estão localizados no terço 5' do genoma; enquanto as proteínas não-estruturais – inclusive a polimerase viral – são codificadas pelo restante do genoma (Figura 7.1).

Entre os vírus em que o genoma possui mais de uma ORF, as proteínas não-estruturais (e a polimerase) são codificadas na região próxima à extremidade 5' do genoma (dois terços do genoma). Apenas a ORF localizada na região próxima à extremidade 5' é traduzida diretamente do RNA genômico, resultando na síntese das proteínas não-estruturais, inclusive a polimerase viral. A(s) outra(s) ORF(s) – embora estejam presentes no sentido do RNA genômico – são expressas a partir de RNAs subgenômicos (mRNAs_g), que são produzidos a partir da transcrição das moléculas de RNA complementar (antigenômicos), ou seja, esses vírus produzem uma parte de suas proteínas (não-estruturais) pela tradução direta

do genoma e outra parte pela tradução de mRNAs subgenômicos (Figura 7.1).

Nesta seção, serão apresentados alguns aspectos das principais estratégias utilizadas pelos vírus RNA de sentido positivo para expressar os seus genes e replicar o seu genoma, utilizando exemplos de diferentes famílias.

2.1 Genomas com uma única ORF, sem produção de mRNA subgenômicos

Importantes vírus animais e de humanos estão incluídos neste grupo, que é composto por membros das famílias *Picornaviridae* e *Flaviviridae*. Dentre os patógenos humanos, estão o poliovírus, os rinovírus, os vírus da dengue e febre amarela, e o vírus da hepatite C. Os principais vírus animais deste grupo são: o vírus da febre aftosa (FMDV, um picornavírus), que possui um impacto sanitário e econômico notável na bovinocultura e na economia de vários países; e os pestivirus (família *Flaviviridae*) vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e vírus da peste suína clássica (CSFV).

2.1.1 Estrutura e organização do genoma

O genoma desses vírus contém uma ORF única e longa, que abrange quase toda a extensão

do genoma (Figura 7.1). Essa ORF é flanqueada por duas regiões não-traduzidas (5'UTR, 3'UTR), que possuem extensões variáveis, de acordo com o vírus (podem atingir até 1.100 nt em alguns picornavírus). A extremidade 5' do genoma possui estruturas especializadas que são importantes para o direcionamento do genoma para o local da replicação (5'VPg), para o início da tradução (*cap* ou IRES) e replicação. A extremidade 3' é poliadenilada ou possui uma sequência de citosinas, como no caso dos pestivírus (Figura 7.1; Tabela 7.2). A região 3' UTR é geralmente menor e possui seqüências importantes para a replicação do genoma.

2.1.2 Tradução e replicação do genoma

A primeira etapa na replicação desses vírus é a tradução do genoma em uma única poliproteína, que é a precursora de todas as proteínas virais

(Figura 7.2). Essa poliproteína é clivada seqüencialmente, à medida que é produzida, originando os precursores intermediários e, finalmente, as proteínas virais maduras. Nos picornavírus, as clivagens são realizadas essencialmente por proteases virais; nos membros da família *Flaviviridae*, essas clivagens são realizadas por proteases virais e celulares.

Uma das proteínas maduras produzidas pela tradução do genoma é a replicase viral (polimerase de RNA dependente de RNA), que se encarrega de replicar o genoma. A replicação ocorre em duas etapas: a) síntese de uma molécula de RNA complementar (com a extensão do genoma) e b) síntese de cópias de RNA de sentido genômico a partir do RNA complementar. As moléculas de RNA de sentido genômico possuem três funções: a) servem de mRNA para a produção da poliproteína; b) servem de molde para a síntese de RNA complementar; e c) são encapsidadas

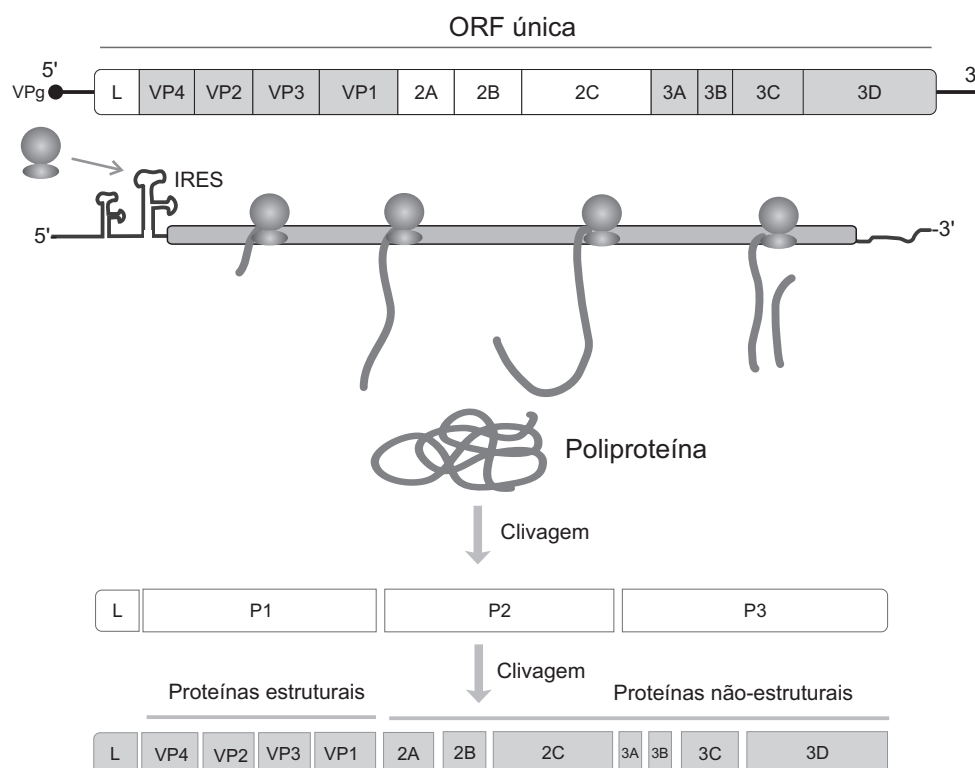


Figura 7.2. Organização do genoma e expressão gênica de um picornavírus (vírus da febre aftosa, FMDV). A estrutura IRES, reconhecida pelos ribossomos, está demonstrada na região 5' não-traduzida. A ORF única e longa é traduzida pelos ribossomos em uma longa poliproteína, que vai sendo clivada por proteases celulares à medida que é produzida. As clivagens seqüenciais originam precursores intermediários e, finalmente, as proteínas virais maduras.

como genoma nas novas partículas virais (Figura 7.3). Após a morfogênese dos vírions, ocorre lise celular e a progênie viral é liberada.

A cinética de replicação dos picornavírus é rápida e o ciclo é completado em cinco a dez horas. O RNA viral (vRNA) é traduzido diretamente pelos polirribossomos, mas, aproximadamente 30 minutos após a infecção, a síntese de proteínas celulares é reduzida drasticamente. Essa supressão da síntese protéica é a causa primária das alterações morfológicas celulares que acompanham a infecção, genericamente denominadas como efeito citopático (ECP). A supressão parece ocorrer pela clivagem de fatores de tradução celulares envolvidos no reconhecimento e ligação às estruturas *cap* dos mRNAs celulares, evento necessário para o início da tradução. Essa clivagem é atribuída à protease 2A dos rinovírus e enterovírus, e à protease L do FMDV. Alguns vírus deste grupo (a maioria dos isolados dos pestivírus) são exceções e não são citolíticos.

Embora o genoma desses vírus se comporte como mRNA e possa ser traduzido em proteínas, a sua estrutura é diferente dos mRNA celulares. Além de codificar as proteínas virais, esta molécula possui importantes seqüências conservadas e estruturas secundárias na região 5' não-traduzida (UTR). Entre as estruturas funcionais mais im-

portantes desta região, destaca-se uma estrutura secundária altamente complexa denominada *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES). Esta estrutura direciona os ribossomos ao códon de iniciação da tradução, sobrepondo-se ao mecanismo usual de iniciação da tradução dos mRNAs celulares. Estruturas IRES já foram identificadas nos genomas dos poliovírus, vírus da encefalomiocardite (EMCV), FMDV, vírus da hepatite A e em alguns membros da família *Flaviviridae* (vírus da hepatite C [HCV] e BVDV).

O mecanismo pelo qual o aparato de tradução celular reconhece o IRES permanece desconhecido, mas a participação de vários fatores de iniciação, além de outros fatores celulares, tem sido proposta. Ao contrário dos poliovírus e dos pestivírus, o genoma dos vírus do gênero *Flavivirus* possui uma estrutura *cap* na extremidade 5', mas parece ser traduzido por um novo mecanismo que não depende do *cap*.

A região 5' UTR do genoma dos vírus RNA de sentido positivo também contém sinais para a replicação do genoma. O balanço entre tradução e replicação parece ser mediado pela interação dessa região com proteínas virais e celulares. Outra estrutura essencial para a replicação, conhecida como sinal *cis-acting* de replicação (*cre*), tem sido identificado no genoma de vários vírus. Essas

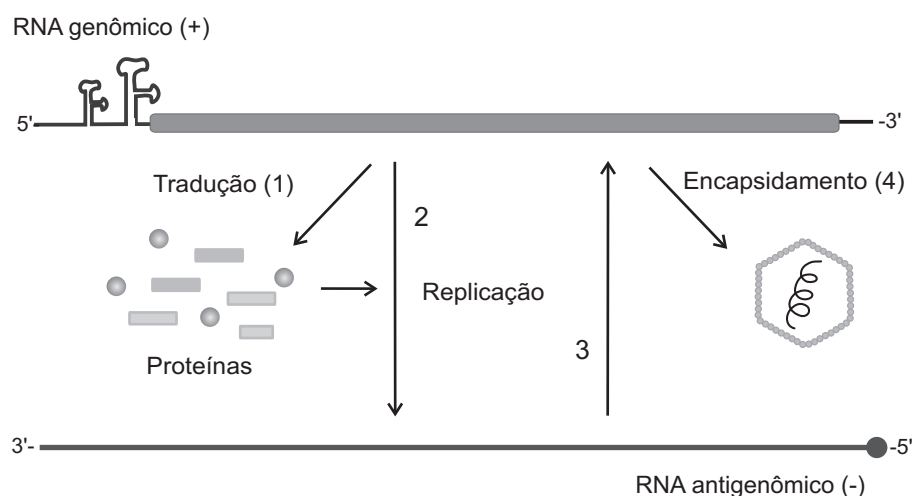


Figura 7.3. Ilustração simplificada das etapas de replicação dos vírus das famílias *Picornaviridae* e *Flaviviridae*. O genoma RNA é, inicialmente, traduzido em proteínas (1). A RNA polimerase produzida nesta etapa sintetiza o RNA complementar (2) e, a seguir, cópias de sentido genômico (3). Além de ser traduzido em proteínas, o RNA de sentido genômico serve de molde para a síntese do RNA complementar e, posteriormente, é encapsidado nas novas partículas víricas (4).

estruturas, embora aparentemente responsáveis pela mesma função, estão localizadas em regiões diferentes dos genomas.

A região 3' UTR do genoma contém estruturas secundárias e terciárias que são importantes durante a replicação do genoma. Acredita-se que ocorre uma interação direta entre as duas UTRs (5' e 3') durante a tradução e replicação, mediada por complexos do RNA com proteínas. Existem ainda evidências de circularização do genoma do vírus da dengue (um flavivírus) através de interação física entre as UTRs 5' e 3'.

Durante a sua replicação, os picornavírus induzem a proliferação de estruturas membranosas envolvidas na replicação viral. Essas membranas podem fornecer fatores celulares necessários para a replicação do RNA. Várias proteínas celulares que interagem com o RNA genômico têm sido identificadas e, em alguns casos, têm sido associadas funcionalmente com a replicação.

2.2 Genomas com mais de uma ORF e produção de mRNAs subgenômicos

Vários patógenos animais e humanos utilizam esta estratégia de expressão gênica e replicação do genoma. Incluem-se entre eles os togavírus Sindbis e vírus das encefalites eqüinas (EEEV, VEEV e WEEV), os calicivírus (calicivírus felino, FCV), os coronavírus (vários patógenos animais e humanos), os arterivírus (PRRSV, vírus da arterite eqüina) e os astrovírus. Pela sua organização genômica e estratégia de expressão similares, os membros das famílias *Coronaviridae* e *Arteriviridae* são agrupados na ordem *Nidovirales*. Os vírus deste grupo de famílias apresentam várias similaridades de estrutura, organização genômica e expressão gênica com o grupo anterior, porém também apresentam importantes diferenças.

2.2.1 Estrutura e organização genômica

Os vírus deste grupo possuem moléculas de RNA de polaridade positiva como genoma, com extensão entre 6.8 kb (astrovírus) a 32 kb (coronavírus). Dependendo da família, a extremidade 5' possui uma proteína ligada (VPg) ou uma estrutura *cap*, enquanto a extremidade 3' é

poliadenilada. Os genes que codificam as proteínas não-estruturais estão localizadas nos dois terços próximos à extremidade 5', e os genes das proteínas estruturais ocupam o terço restante do genoma. Uma característica comum a todos esses vírus é a produção de mRNA subgenômicos (mRNAsg), em número e extensão variáveis, que são traduzidos nas proteínas estruturais.

2.2.2 Expressão gênica e replicação do genoma

A expressão gênica e a replicação do genoma desses vírus apresentam algumas semelhanças com o grupo anterior: a) o genoma serve de mRNA e é traduzido diretamente pelos ribossomos; b) a tradução resulta na produção de poliproteínas, que são posteriormente clivadas nas proteínas individuais; e c) a replicação do genoma ocorre via produção de um RNA de sentido antígeno. As principais diferenças se referem à organização do genoma (posição dos genes das proteínas estruturais *versus* não-estruturais), número de ORFs e produção de mRNAsg.

Dentre esses vírus, os mais estudados são os coronavírus e os togavírus. A seguir, será descrita a expressão gênica e replicação do vírus Sindbis, um togavírus responsável por encefalomielite aguda em camundongos e extensivamente estudado como modelo para diversos aspectos da Virologia.

O genoma desse vírus contém duas ORFs, cada uma codificando quatro proteínas (Figura 7.4). Inicialmente, a ORF situada próxima à extremidade 5' do genoma é traduzida, resultando na produção de uma poliproteína. Esta poliproteína é clivada à medida que vai sendo produzida, originando as proteínas não-estruturais, incluindo a replicase viral. Esta polimerase sintetiza, então, uma cópia de RNA de sentido negativo (complementar ou antígeno) com a extensão completa do genoma. A molécula de RNA complementar serve para dois propósitos: a) molde para a síntese de RNAs de sentido e extensão genômicos que são encapsidados na progênie viral e b) molde para a síntese de mRNAs subgenômicos. Esses mRNAsg são traduzidos em uma poliproteína que origina, por clivagem, as proteínas

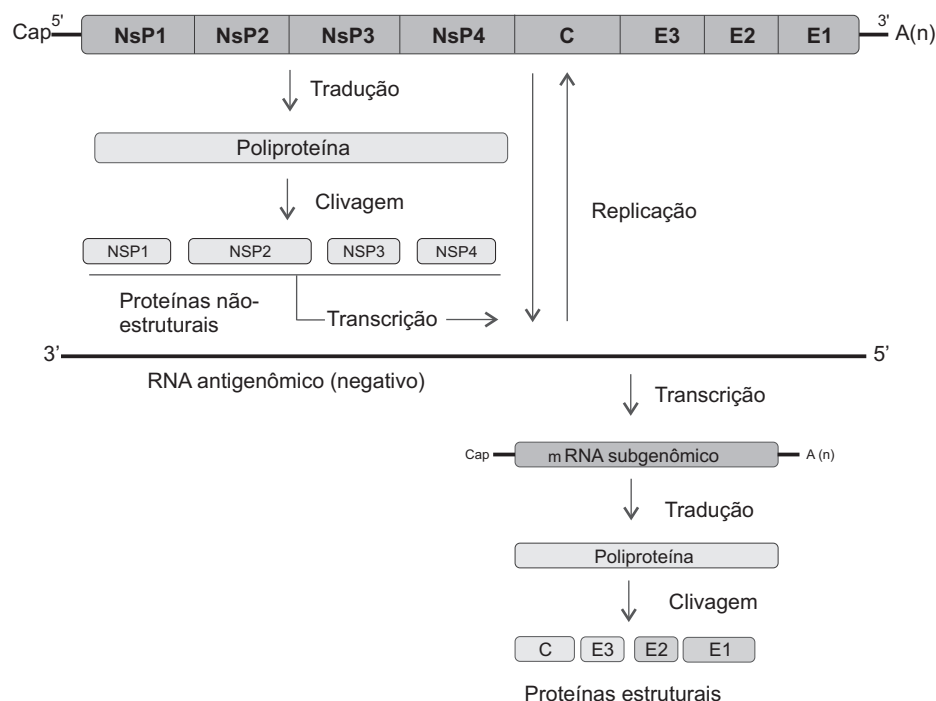


Figura 7.4. Ilustração esquemática da expressão gênica e replicação dos togavírus (vírus Sindbis).

do capsídeo e envelope. Os nucleocapsídeos se formam no citosol, pela associação de múltiplas cópias da proteína do capsídeo com o genoma RNA. As glicoproteínas do envelope são inseridas em membranas de organelas celulares, e os vírions maturam por brotamento na membrana plasmática.

A transcrição dos mRNAs (uma única espécie, no caso dos togavírus) ocorre por iniciação em um sítio ou promotor interno. Uma vez sintetizados, esses mRNAs não são reconhecidos como molde pela polimerase viral e apenas servem para a tradução nas proteínas estruturais. Essa estratégia permite a separação temporal da síntese de proteínas regulatórias (iniciais) e estruturais (tardias). A replicação desses vírus é um pouco mais complexa do que a dos picornavírus, e a célula deve manter a sua integridade para permitir o brotamento contínuo das novas partículas víricas. De fato, a redução da síntese proteica celular é muito menos dramática até mesmo em fases tardias da infecção.

A replicação dos calicivírus e astrovírus não tem sido tão caracterizada como os togavírus, pois alguns desses vírus não replicam com efici-

ência em cultivo celular. No entanto, os vírus de ambas as famílias também produzem mRNAs durante a sua replicação.

Os coronavírus e arterivírus replicam fazendo uso de um mecanismo similar. Nos coronavírus, uma série de 5 a 7 mRNAs sobrepostos são produzidos pela transcrição do RNA antígeno-mico (Figura 7.1). Cada mRNA inicia com uma região líder 5' idêntica (com *cap*), o que indica um mecanismo mais complexo de iniciação do que o simples reconhecimento de um promotor interno. Todos os mRNAs possuem a mesma extremidade 3' e são traduzidos em várias proteínas estruturais.

A exemplo dos outros vírus RNA de sentido positivo, a replicação desse grupo de vírus ocorre em complexos replicativos associados com membranas intracelulares. As estruturas formadas e a origem das membranas envolvidas, no entanto, variam entre os vírus. Por exemplo, os complexos replicativos de vários picornavírus e flavivírus são associados com o retículo endoplasmático, enquanto os togavírus utilizam também as membranas dos endossomos e lisossomos como sítios de replicação.

3 Vírus com genoma RNA de sentido negativo

Os vírus com genoma RNA de sentido negativo apresentam uma maior diversidade do que o grupo anterior. Esses vírus possuem o genoma geralmente mais extenso e codificam um número maior de proteínas. Essa complexidade pode dever-se às dificuldades adicionais da sua expressão gênica e replicação, o que faz com que necessitem codificar mais proteínas e com funções diversas.

Os genomas dos vírus RNA de sentido negativo não são traduzidos diretamente em proteínas, pois não possuem as ORFs no sentido genômico. Ao contrário, as ORFs estão presentes na fita de RNA complementar (RNA antígenômico). A síntese das proteínas virais, portanto, requer a prévia produção de mRNAs. Estes mRNAs são transcritos pela transcriptase/replicase viral, usando o RNA genômico como molde. Como o RNA genômico não é traduzido diretamente – e assim a polimerase não é produzida no início do ciclo, como no grupo anterior – esses vírus necessitam trazer, nos vírions, as enzimas necessárias para a síntese de RNA antígenômico e mRNA.

Os vírus RNA de sentido negativo compartilham algumas características, tais como: a) os vírions contêm cópias da enzima replicase; b) o RNA genômico desprovido de proteínas não é infeccioso; c) são produzidos mRNAs individuais para cada gene, ou seja, são RNAs monocistônicos; d) os mRNAs possuem 5'cap e são poliadenilados (existem exceções); e) o genoma permanece associado com proteínas durante a transcrição e replicação; f) o RNA genômico de vários desses vírus forma estruturas semelhantes a cabos de panela (*panhandles*), pela associação de seqüências complementares presentes nas extremidades.

Neste grupo são encontrados vírus com dois tipos de organização genômica: os vírus com o genoma não-segmentado, ou seja, uma molécula única de RNA; e os vírus com o genoma dividido em vários segmentos.

A estratégia de expressão gênica e replicação do genoma dos vírus RNA de sentido negativo é muito similar. Cada gene origina um mRNA que codifica uma proteína, ou seja, são mRNAs monocistônicos. A replicação do genoma ocorre

por meio da produção de uma molécula de RNA complementar (antígenômico), que serve de molde para a síntese de RNA genômico.

Nos vírus com o genoma não-segmentado, são produzidos vários mRNAs de extensão curta, cada um correspondendo a um único gene. À medida que os mRNAs são transcritos, ocorre a atenuação da transcrição, sendo produzida uma quantidade maior de mensageiros dos genes localizados na extremidade 3' do genoma. Esses mRNAs serão traduzidos em proteínas. A produção do RNA complementar (intermediário na replicação do genoma) envolve a transcrição completa do genoma. Para isso, a replicase ignora os sinais de terminação de cada gene e prossegue transcrevendo até a extremidade 5' da molécula molde.

Nos vírus com o genoma segmentado, cada segmento genômico codifica um ou ocasionalmente dois produtos. Cada mRNA corresponde aproximadamente à extensão completa do respectivo segmento genômico. Esses mRNAs possuem 5' cap e são poliadenilados na extremidade 3'. Os RNAs antígenômicos – que servirão de molde para a síntese de cópias de RNA genômico – possuem uma extensão semelhante, mas não possuem cap na extremidade 5' e nem poliA na extremidade 3'.

3.1 Vírus com o genoma não-segmentado

Os membros de quatro famílias de vírus possuem genoma RNA negativo não-segmentado (Tabela 7.1). As famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* e *Rhabdoviridae* compõem a ordem *Mononegavirales*, pelas semelhanças na estrutura e organização genômica, estratégia de expressão gênica e replicação do genoma e por semelhanças estruturais e funcionais das proteínas. Uma característica marcante da replicação desses vírus é a grande estabilidade do complexo ribonucleoproteína (genoma + nucleoproteína, RNP). Esse complexo nunca é desfeito durante as diferentes etapas do ciclo replicativo, ou seja, a transcrição e a replicação ocorrem utilizando, como substrato (ou molde), um RNA fortemente recoberto por múltiplas cópias da nucleoproteína (N ou NP). Esses vírus apresentam também um mecanismo interessante de regulação na trans-

criação dos diferentes genes, chamado de atenuação da transcrição, o que resulta na produção de quantidades de proteínas de acordo com a necessidade do vírus. Os bornavírus apresentam alguns aspectos únicos, como a transcrição e replicação nuclear, *splicing* alternativo dos transcritos primários policistrônicos, uso diferencial de sinais de início e término de transcrição. Esses aspectos os distinguem dos paramixovírus, filovírus e rabdovírus.

As seguir, serão abordados os principais aspectos da expressão gênica e replicação do vírus da estomatite vesicular (VSV), um membro da família *Rhabdoviridae*. Grande parte das informações se aplica também aos outros membros da ordem *Mononegavirales*.

3.1.1 Estrutura e organização do genoma

A estrutura e organização do genoma de vírus representativos das três famílias que compõem a ordem *Mononegavirales* estão apresenta-

dos na Figura 7.5. Variações na extensão do genoma, no número de genes e na extensão das regiões intergênicas (IR) são encontradas nos vírus das diferentes famílias. Porém, todos eles possuem um grupo principal de genes em comum e a organização genômica é muito semelhante.

O genoma do VSV é formado por uma molécula de RNA linear de fita simples, com aproximadamente 11 kb. Os rabdovírus, em geral, codificam um mínimo de cinco genes, na ordem 3' N – P – M – G – L 5', e o VSV codifica outras duas pequenas proteínas (C e C') em outra fase de leitura do gene P. Nos paramixovírus, várias proteínas são produzidas a partir do gene P, pela utilização de diferentes códon de iniciação, tradução de diferentes ORFs e por um mecanismo de edição. Neste mecanismo, são adicionadas uma, duas ou três guaninas (G) em um determinado ponto do mRNA, resultando em mudança de fase de leitura a partir deste local. Próximo à extremidade 3', existe uma região não-codificante, que é transcrita em um polinucleotídeo denominado líder. A sequência líder possui 47 nt (no

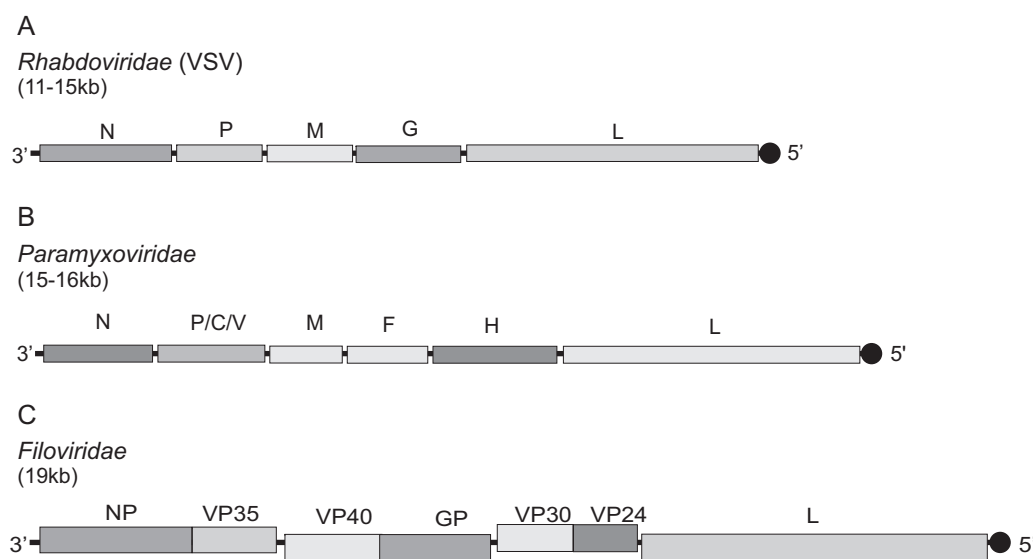


Figura 7.5. Estrutura e organização do genoma de três vírus representativos das famílias que compõem a ordem *Mononegavirales*. A) *Rhabdoviridae* (vírus da estomatite vesicular, VSV); B) *Paramyxoviridae* (vírus da cinomose, CDV); C) *Filoviridae* (vírus Ebola). O genoma consiste de uma molécula linear de RNA de polaridade negativa, representada pelo traço contínuo. Os blocos representam os genes, com regiões intergênicas (IRs) entre eles. N ou NP): nucleoproteína; P: fosfoproteína (C e V, produtos secundários do gene P); M (VP40): proteína da matriz; G: glicoproteína do envelope; F: proteína de fusão; H: proteína de ligação aos receptores, hemaglutinina; L: polimerase viral. VP35: cofator para a transcrição e replicação; VP35: cofator para a transcrição e replicação; VP30: nucleoproteína menor; VP24: proteína do envelope. O número de genes pode variar entre os vírus de cada família.

VSV), não possui *cap*, não é poliadenilado e não é traduzido em proteína. Logo após, existe um sinal para o início da transcrição do primeiro gene, que é seguida da adição de 5' *cap* no mRNA resultante. Entre os genes, existem as regiões intergênicas (IR), sendo que cada uma possui um sinal para a terminação da transcrição do gene anterior, uma pequena região interveniente e um sinal para a iniciação da transcrição do gene subsequente (Figura 7.6). Próximo à extremidade 5', existe uma região não-traduzida, denominada *trailer*. Em todas as etapas da replicação, o genoma permanece fortemente associado com múltiplas cópias da nucleoproteína N, formando o complexo ribonucleoproteína (RNP).

3.1.2 Transcrição

Após a penetração e perda do envelope, o nucleocápsídeo (RNA + proteína) serve de molde

para a transcrição, que é realizada pela replicase viral. O complexo replicase é formado pelas proteínas L e P. A transcrição se inicia na extremidade 3', a partir de onde a transcriptase sintetiza a sequência líder de 47 nt. Segue-se, então, a transcrição individual e sequencial de cada gene, resultando em mRNAs individuais que possuem a estrutura *cap* na extremidade 5' e são poliadenilados na extremidade 3'. A cada região intergênica, a transcriptase faz uma pausa de aproximadamente 1 a 2 minutos e prossegue transcrevendo o gene seguinte. No entanto, apenas 70 a 80% das replicases prosseguem transcrevendo o próximo gene. As demais se dissociam do genoma e cessam a transcrição. Esse mecanismo de transcrição sequencial, acompanhado de redução do número de transcriptases que prosseguem a síntese de RNA após cada IR, gera um gradiente de transcrição que é importante para a regulação da quantidade de mRNA produzido de cada gene. Assim,

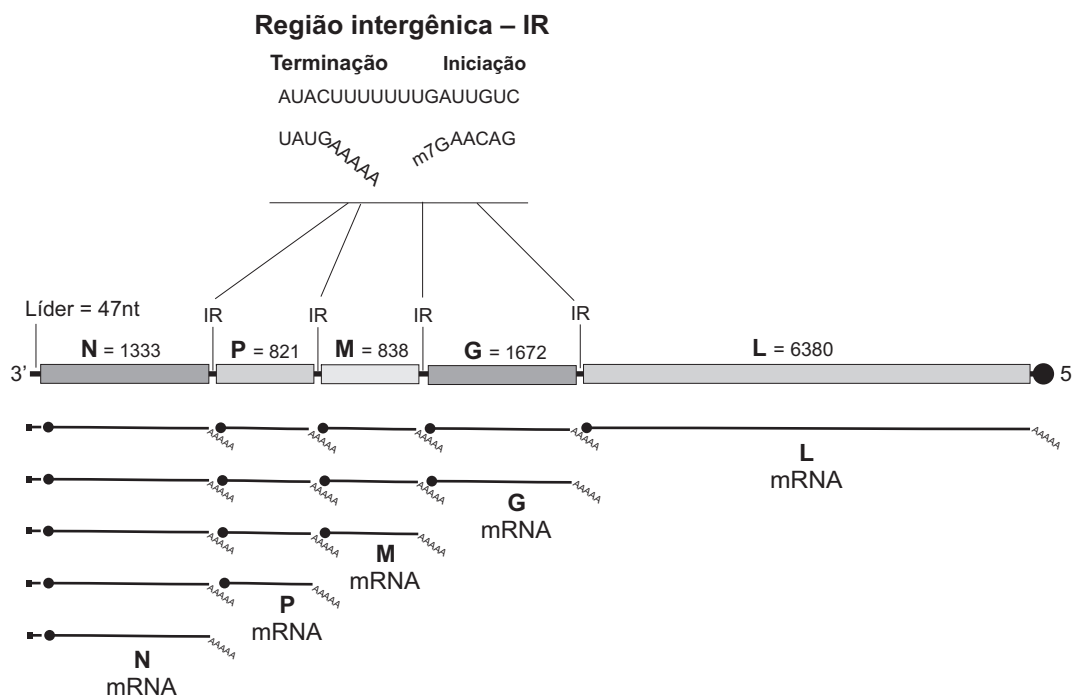


Figura 7.6. Organização do genoma e estratégia de transcrição do vírus da estomatite vesicular (VSV) da família *Rhabdoviridae*. O genoma é representado pela linha contínua (as extremidades 3' e 5' e a sequência líder estão indicados). Os blocos representam os genes, com o número respectivo de nucleotídeos. Acima do genoma está apresentada a sequência comum das regiões intergênicas (IR), com os sinais para a terminação e início da transcrição dos genes subsequentes. Abaixo do genoma, estão representados os mRNAs produzidos pela transcrição sequencial dos genes. O número relativo de mRNAs decresce à medida que a transcrição se distancia do seu início. N) nucleoproteína; P) fosfoproteína; M) proteína da matriz; G) glicoproteína do envelope; L) polimerase.

cada gene localizado na direção 5' do genoma é transcrito por um número progressivamente menor de transcriptases, resultando em quantidades decrescentes de mRNAs. Esse mecanismo é denominado atenuação da transcrição (*transcription attenuation*). (Figura 7.6).

3.1.3 Replicação do genoma

A replicação do genoma inicia em um determinado momento do ciclo, após a síntese de quantidade suficiente de proteínas virais, principalmente de nucleoproteína. A replicação do genoma desses vírus ocorre em duas etapas e envolve a síntese de uma molécula de RNA complementar com a extensão total do genoma. A replicase não interrompe a transcrição a cada IR, ignorando os sinais de terminação da transcrição até a extremidade 5'. Os mecanismos responsáveis pela transição entre transcrição descontínua (síntese de mRNAs) e transcrição contínua (síntese de RNA complementar) não são completamente conhecidos, mas parecem ser dependentes do acúmulo da proteína N (e provavelmente a P) nas

etapas iniciais do ciclo. Múltiplas cópias da proteína N se conjugariam fortemente com o transcrito líder, provocando um sinal de antiterminação, que interferiria com a capacidade da replicase de reconhecer os sinais de terminação presentes no final de cada gene, resultando na síntese de uma molécula de RNA complementar com a extensão do genoma (Figura 7.7). Outro modelo para a troca do modo de transcrição descontínua para a replicação sugere que dois complexos enzimáticos diferentes seriam responsáveis por cada um desses mecanismos. A fosforilação da proteína P, que faz parte do complexo, converteria o complexo transcriptase (que realiza a transcrição descontínua) em complexo replicase (que realiza a transcrição contínua).

O RNA antigenômico serve de molde para a síntese das cópias genômicas. Esse processo é facilitado pela inexistência de sinais de terminação da transcrição neste sentido do RNA. Tanto a síntese de RNA antigenômico como a de RNA genômico são seguidas pela imediata encapsidação dos RNAs recém-produzidos pela proteína N. As etapas de transcrição e replicação do genoma do VSV estão ilustradas na Figura 7.7.

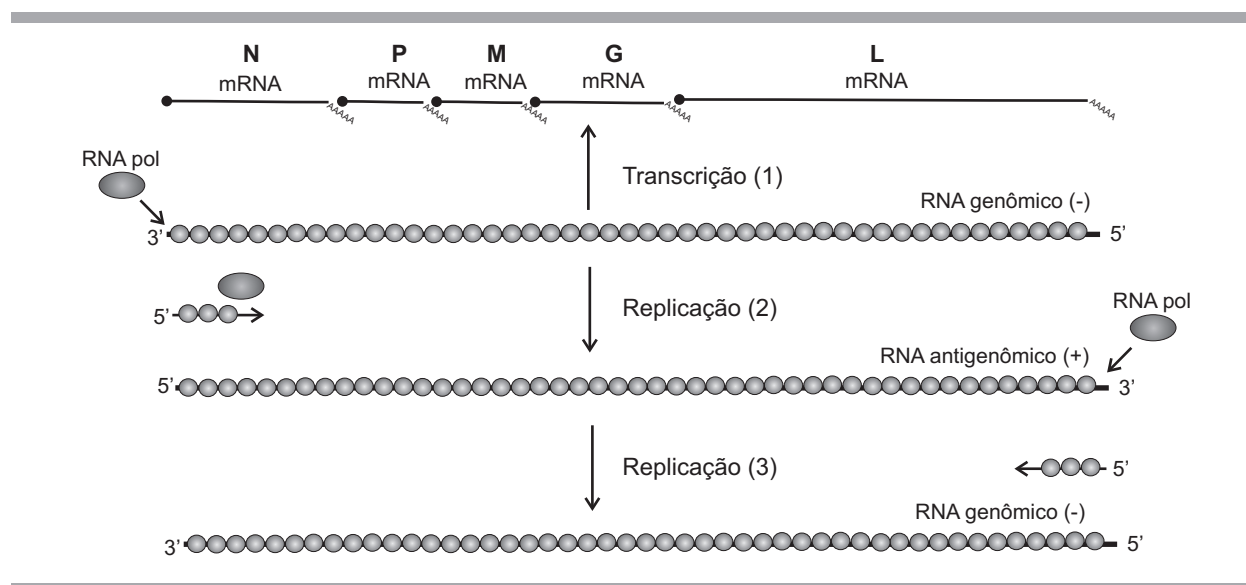


Figura 7.7. Etapas da transcrição e replicação do genoma do vírus da estomatite vesicular (VSV). A linha contínua representa a molécula de RNA genômico, recoberta por múltiplas cópias da nucleoproteína. No início do ciclo replicativo, a transcrição descontínua resulta em mRNAs individuais de cada gene (1). Em uma determinada etapa, com o acúmulo da nucleoproteína (N), o complexo replicase realiza a síntese da molécula de RNA complementar (2), que serve de molde para a síntese de moléculas de RNA genômico (3). Note que tanto o RNA genômico (-) quanto o RNA antigenômico ou complementar (+) permanecem recobertos por moléculas da proteína N (ou NP) durante os processos de transcrição e replicação. As etapas ilustradas acima são comuns aos vírus da ordem *Mononegavirales*.

3.2 Vírus com o genoma segmentado

Vírus de três famílias possuem este tipo de genoma: *Orthomyxoviridae* (7 ou 8 segmentos); *Bunyaviridae* (três segmentos) e *Arenaviridae* (dois segmentos). Os ortomixovírus e a maioria dos bunivírus possuem o genoma inteiramente de sentido negativo, ou seja, as ORFs estão presentes no RNA complementar. O genoma dos arenavírus e de alguns bunivírus possui sentido *ambissense*, ou seja, contém algumas ORFs no sentido do RNA genômico e outras no sentido do RNA complementar. O genoma não é traduzido diretamente, e esses vírus necessitam trazer a sua replicase nos vírions. Por isso são classificados como vírus RNA de sentido negativo.

Os ortomixovírus possuem o genoma segmentado (influenza A e B = oito segmentos; influenza C = 7 segmentos) e replicam o genoma no núcleo da célula hospedeira. A replicação no núcleo faz desses vírus exceções entre os vírus

RNA, juntamente com os bornavírus. A descrição a seguir abordará o vírus da influenza A.

O genoma do vírus da influenza A constitui-se por oito segmentos de RNA de polaridade negativa, numerados de 1 a 8. Os segmentos 1 a 6 codificam uma proteína cada; os segmentos 7 e 8 codificam duas proteínas cada. Todos os segmentos genômicos apresentam a mesma organização geral: possuem um gene (ou mais) na região central, flanqueada por seqüências altamente conservadas nas extremidades 3' (12 nt) e 5' (13 nt) (Figura 7.8). As regiões terminais possuem sinais para o início da transcrição e replicação. Cada segmento genômico encontra-se recoberto (encapsidado) por múltiplas cópias da proteína NP e está associado com algumas proteínas que formam o complexo polimerase-replicase. Esse complexo é formado por três proteínas principais: PB1 (polimerase básica 1); PB2 (polimerase básica 2) e PA (polimerase ácida). O complexo RNA + proteínas associadas se denomina ribonucleoproteína (RNP) e permanece estável durante a replicação.

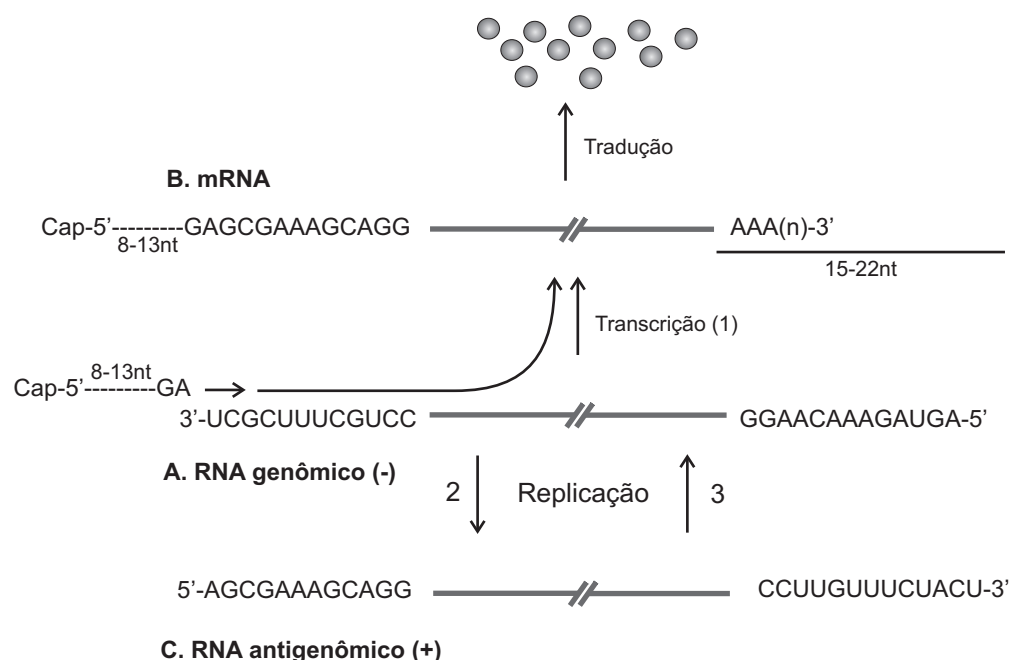


Figura 7.8. Estrutura dos RNAs produzidos durante a replicação do vírus da influenza. A) RNA genômico (vRNA); B) mRNA; C) RNA antigenômico. A transcrição para a síntese de mRNA utiliza nucleotídeos com cap subtraídos dos mRNA celulares (1). Os mRNA apresentam uma extensão de 8-13 nt (com cap) em relação ao vRNA e os 15-22 nucleotídeos terminais são substituídos por uma cauda poliA. A primeira etapa da replicação do genoma envolve a síntese do RNA de sentido antigenômico que é exatamente complementar ao vRNA (2). A segunda etapa da replicação envolve a síntese do vRNA ou genômico a partir do RNA antigenômico (3). Note que os mRNAs diferem dos RNA antigenômicos, pela presença de 8-13 nt adicionais com cap e cauda poliA.

Cada segmento genômico é transcrito individualmente pelo complexo transcriptase. O processo se inicia pela subtração de seqüências de 8 a 13 nt, com *cap* na extremidade 5', de mRNAs celulares. Essa atividade é atribuída à PB1, ou seja, essa enzima literalmente furta os segmentos iniciais de mRNAs celulares. Esses nucleotídeos servem de *primer* para o início da transcrição, além de possuírem a estrutura *cap*, que é necessária para a tradução dos mRNA virais. A transcrição termina 15 a 22 nt antes da extremidade 5' de cada segmento, e é seguida pela adição de uma cauda de poliA. Os mRNAs virais não são, portanto, exatamente complementares aos RNAs genômicos: possuem uma extensão de 8 a 13 nt em sua região 5' e não possuem os 15-22 nt terminais, sendo substituídos por uma cauda poliA.

A replicação dos RNA genômicos (vRNA) ocorre em duas etapas: síntese do RNA antígenômico (complementar) e síntese de RNA genômico (vRNA), utilizando o RNA antígenômico como molde. A síntese do RNA antígenômico não envolve a subtração de nucleotídeos com *cap* de mRNA celulares; inicia-se exatamente na extremidade 3' do genoma e termina exatamente na extremidade 5'. Dessa forma, o RNA antígenômico é exatamente complementar ao RNA genômico. A transição entre a transcrição iniciada por *primer* + *cap* para a transcrição independente de *primer* + *cap* parece envolver complexos transcriptase/replicase diferentes. O acúmulo da proteína NP e alterações específicas na composição do complexo polimerase seriam responsáveis pela transição entre transcrição e replicação. A Figura 7.8 apresenta a estrutura dos vRNA, mRNA e RNAs antígenômicos produzidos durante a replicação dos vírus da influenza A.

3.3 Vírus com o genoma *ambissense*

Os arenavírus e alguns bunivírus possuem genoma *ambissense*, ou seja, alguns genes são codificados no sentido do RNA complementar, enquanto outros são codificados no sentido do genoma, após a síntese de mRNA, a partir da cópia complementar de RNA. Em outras palavras, as ORFs de alguns genes estão presentes no RNA

genômico (sentido positivo) e outras estão presentes no RNA complementar (sentido negativo). As ORFs que estão no sentido do genoma ocupam a metade 3' do genoma e não são traduzidas diretamente. Como o genoma não é traduzido diretamente pelos ribossomos, esses vírus necessitam trazer, nos vírions, a sua enzima transcriptase/replicase e, por isso, são classificados juntamente com os vírus RNA de sentido negativo.

Os arenavírus possuem dois segmentos de RNA como genoma: um segmento grande (*large* = L) e outro segmento pequeno (*small* = S). Cada um desses segmentos contém dois genes (Figura 7.9A). No segmento grande, o gene L possui polaridade negativa, ou seja, a sua ORF está presente no RNA complementar. Para que a proteína seja expressa, esse gene é transcrito pela polimerase viral, originando um mRNA, que é, então, traduzido (Figura 7.9B). Por outro lado, o gene Z possui polaridade positiva (a ORF está presente no RNA genômico do segmento L). No entanto, este gene não é expresso pela tradução direta do genoma. A sua expressão somente ocorre após a síntese do RNA complementar, a partir do qual o mRNA é, então, produzido (Figura 7.9B). A expressão deste gene segue o mesmo padrão dos genes expressos através de mRNA subgenômicos, característicos de algumas famílias de vírus RNA. No segmento S, o gene NP possui polaridade negativa e a sua expressão depende da síntese de mRNA. O gene GP possui polaridade positiva e a sua expressão segue o mesmo padrão do gene Z do segmento L: síntese do RNA complementar e transcrição do seu mRNA. A estratégia *ambissense* de codificação de proteínas é encontrada ainda em vírus de alguns gêneros da família *Bunyaviridae* (Tospovírus e Phlebovírus).

A replicação do genoma segue o padrão dos outros vírus RNA e ocorre por intermédio de um RNA complementar de sentido antígenômico. A diferença é que o RNA complementar serve de molde para a síntese do RNA genômico e também para a síntese do mRNA de um dos genes.

Em resumo, os genomas *ambissense* possuem genes que são expressos de maneira semelhante aos genomas RNA de sentido negativo (as ORFs estão presentes no RNA complementar); e genes

que são expressos como nos vírus RNA de sentido positivo (as ORFs estão presentes no sentido genômico, embora não sejam traduzidas diretamente).

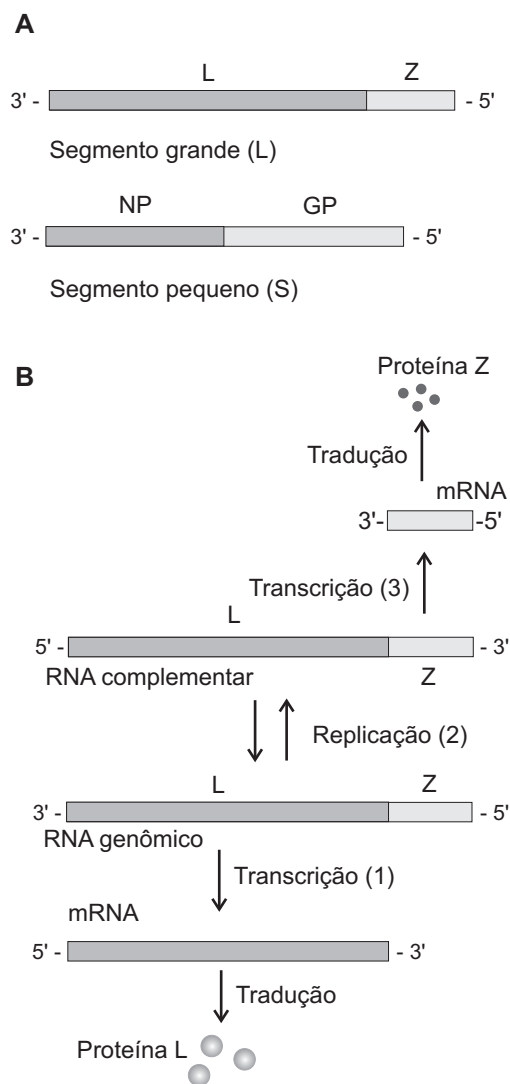


Figura 7.9. Estrutura e expressão do genoma ambissense dos arenavírus. A) Organização dos segmentos genômicos L (grande) e S (pequeno) com os respectivos genes; B) Estratégia de expressão gênica do segmento grande. O gene L possui sentido negativo e a sua expressão depende inicialmente da transcrição e síntese de mRNA (1). O gene Z possui sentido positivo, mas não é expresso pela tradução direta do genoma. A sua expressão ocorre somente após a síntese do RNA complementar (2). Este serve de molde para a transcrição e produção do mRNA correspondente (3). Os genes NP e GP do segmento S seguem os mesmos padrões de expressão dos genes L e Z, respectivamente.

4 Vírus com RNA de fita dupla

São conhecidas atualmente seis famílias de vírus que possuem RNA de fita dupla (ds RNA) como genoma, e apenas duas abrigam vírus que infectam vertebrados (*Reoviridae* e *Birnaviridae*); destas, apenas a primeira possui patógenos de mamíferos. A família *Reoviridae* é a maior e mais diversa dessas famílias, contendo importantes patógenos animais. O genoma desses vírus é composto por 10, 11 ou 12 segmentos de dsRNA, dependendo do gênero. A maioria dos segmentos codifica apenas uma proteína, mas alguns podem codificar duas. Nos segmentos duplos de RNA, apenas uma das fitas contém as ORFs codificantes de proteínas. O complexo replicase é trazido nos vírions, associado aos segmentos, e a síntese dos mRNA virais ocorre no interior dos capsídeos semi-integros.

4.1 Estrutura e organização do genoma

Os vírus do gênero *Orthoreovirus* possuem os protótipos da família *Reoviridae*, os reovírus não-fusogênicos de mamíferos. O genoma desses vírus é composto por dez segmentos de dsRNA. Os segmentos genômicos são denominados de acordo com a sua migração em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE): L = grandes (L1, L2, L3); M = médios (M1, M2 e M3) e S = pequenos (S1, S2, S3 e S4). Somente os segmentos S1 e M3 originam duas proteínas, o restante codifica apenas uma. Os dez segmentos dos orthoreovírus são lineares e possuem as extremidades livres. Embora se constituam em segmentos separados, algumas evidências indicam que os segmentos genômicos encontram-se associados através de suas extremidades nas partículas víricas. Cada segmento de polaridade positiva possui uma estrutura *cap* (7-M-guanina) na extremidade 5', que provavelmente é adicionado por enzimas virais no interior dos capsídeos. As extremidades 5' dos segmentos de polaridade negativa possuem um nucleotídeo difosfato. A cadeia codificante (e os mRNAs) possuem uma região não-traduzida de

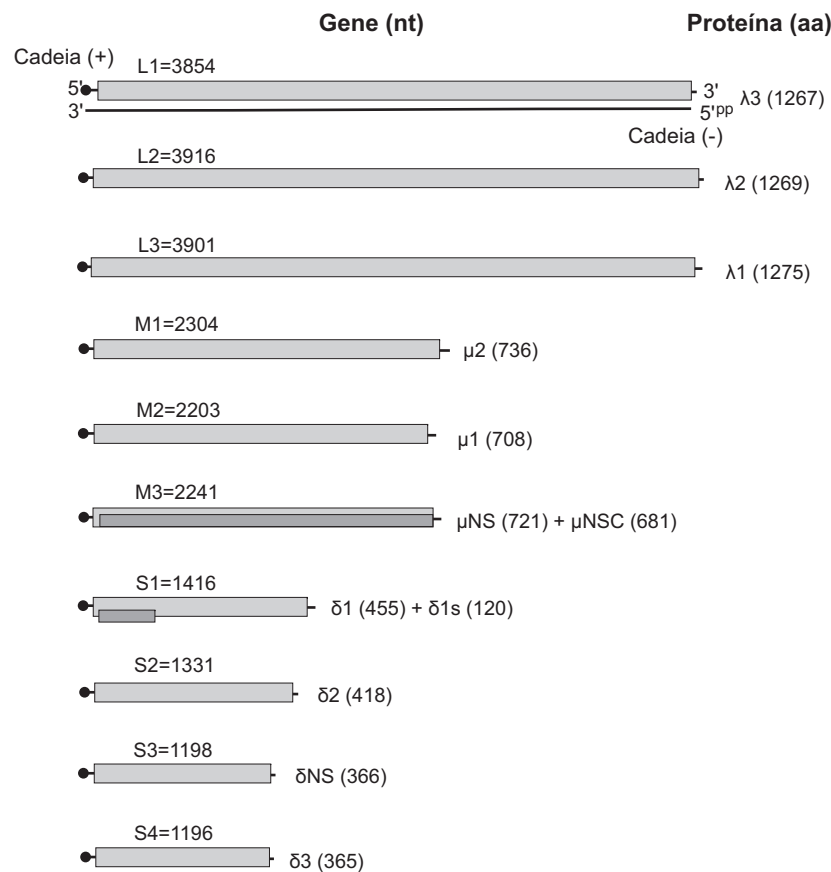


Figura 7.10. Organização do genoma dos vírus do gênero *Orthoreovirus* da família *Reoviridae*. O genoma é composto por 10 segmentos de RNA de fita dupla, sendo que apenas uma das cadeias é codificante (sentido positivo). No segmento L1, são mostradas as duas cadeias, os demais mostram apenas a cadeia codificante. Os diferentes segmentos apresentam uma organização semelhante, possuindo uma ORF central flanqueada por pequenas regiões não-traduzidas nas extremidades 5' e 3'. A nomenclatura e número de aminoácidos de cada proteína estão apresentados à direita. Note que oito segmentos codificam apenas uma proteína cada; os segmentos M3 e S1 codificam dois produtos cada.

12 a 32 nt próxima à extremidade 5' e outra região não-traduzida de 35 a 73 nt na extremidade 3', intercaladas por ORFs que possuem entre 365 e 1.289 nt (Figura 7.10). Essas regiões não-codificantes possuem sítios regulatórios da transcrição e tradução.

4.2 Transcrição

A transcrição inicial ocorre ainda no interior dos capsídeos, logo após a penetração dos vírions no citoplasma da célula hospedeira, e apenas as cadeias negativas são transcritas. Os mRNAs in-

dividuais são exatamente complementares aos RNA moldes: possuem 5' *cap* e não são poliadenilados. Por isso servem tanto para a tradução como de molde para a síntese do RNA complementar (Figura 7.11). Os mRNAs tardios, produzidos após a replicação do genoma, constituem uma exceção por não receberem *cap* na extremidade 5'. Os mRNAs são rapidamente exportados dos capsídeos e ganham acesso ao citoplasma para serem traduzidos. Em fases adiantadas do ciclo, já no interior de capsídeos recém-formados, ocorre um novo ciclo de transcrição com a produção de mais mRNA.

4.3 Replicação do genoma

A segunda etapa da replicação, a síntese das cadeias negativas, ocorre já em capsídeos pré-formados no citoplasma da célula hospedeira, em um local chamado de viroplasma, que constitui uma fábrica de vírus dentro da célula hospedeira. Para que isso ocorra, as proteínas que formam os capsídeos já são produzidas em etapas iniciais do ciclo replicativo. Cada segmento de RNA (+) serve de molde para a síntese da cadeia complementar (-), que permanece pareada com o molde, restabelecendo, assim, a molécula genômica dsRNA. A síntese da cadeia negativa se inicia na extremidade 3' da molécula molde e prossegue até a extremidade 5'. Por isso, as cadeias positivas e negativas são exatamente complementares (Figura 7.11).

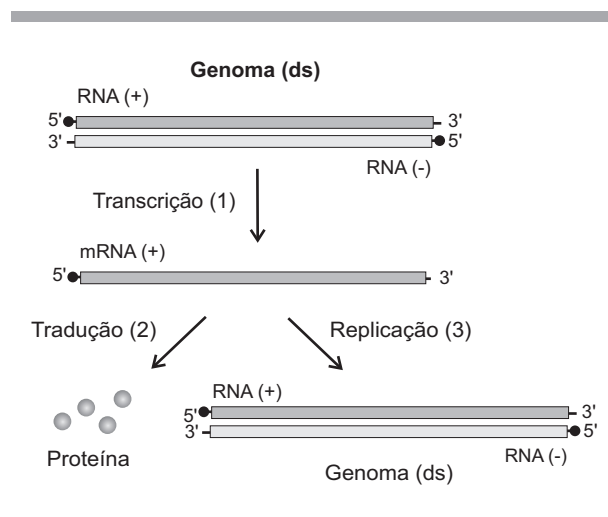


Figura 7.11. Etapas da expressão gênica e replicação dos vírus RNA de fita dupla. A fita negativa do genoma é transcrita, originando RNAs de sentido positivo exatamente complementares (1). Estes RNAs podem ser traduzidos em proteínas (2) e também servem de molde para a síntese da molécula de sentido negativo (3), restabelecendo a molécula genômica de dsRNA.

5 Retrovírus

Os retrovírus apresentam uma estratégia peculiar de replicação do genoma que difere dos demais vírus RNA (Figura 7.12). Embora esses vírus codifiquem as suas proteínas no sentido do genoma (por isso são considerados vírus RNA de sentido positivo), o genoma não é traduzido

diretamente. A replicação também não ocorre por meio de um intermediário RNA, como nos outros vírus RNA. Ao contrário, a replicação do genoma ocorre por meio de um intermediário DNA. Parte das etapas de replicação do genoma ocorre no citoplasma e parte ocorre no núcleo da célula hospedeira. Resumindo, as principais peculiaridades do genoma e da replicação desses vírus são: a) o seu genoma é diplóide, ou seja, é composto por duas moléculas idênticas de RNA; b) o RNA genômico possui polaridade positiva, porém não é traduzido em proteínas; c) a replicação do genoma ocorre por meio da síntese de um intermediário DNA (provírus), que é incor-

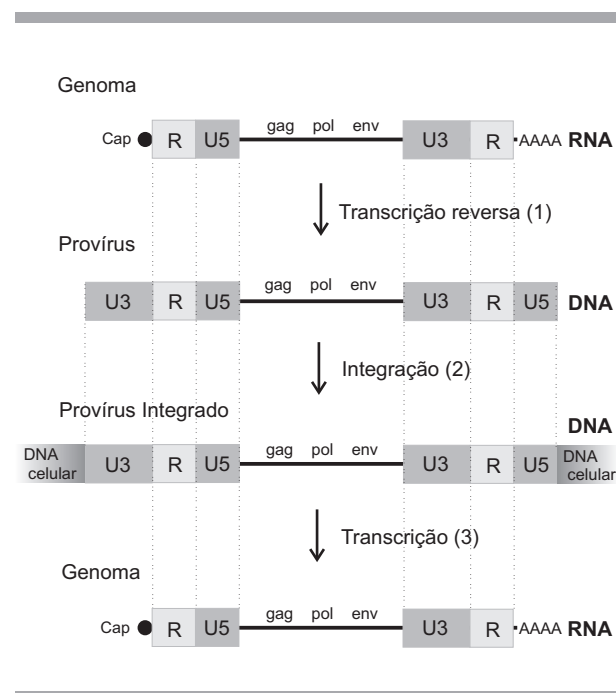


Figura 7.12. Ilustração da estrutura e etapas da replicação do genoma dos retrovírus. O genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples de 7 a 10 kb com 5'cap e poliA. Próximo às extremidades, o genoma possui duas regiões repetidas R (5' e 3') e duas regiões únicas (U5 e U3). Entre essas regiões, localizam-se as sequências codificantes: genes *gag*, *pol* e *env*. A primeira etapa da replicação é síntese do provírus DNA (molécula de DNA de fita dupla correspondente ao genoma) pela enzima viral transcriptase reversa (1). O provírus contém as regiões U3 e U5 duplicadas nas extremidades opostas e é integrado aos cromossomos celulares pela ação da enzima viral integrase (2). Após a integração, o provírus é transcrito pela RNA polimerase II celular (3) originando mRNAs idênticos ao genoma. Estes mRNAs servem para a tradução em proteínas e também constituem o RNA genômico para serem encapsulados na progênie viral.

porado aos cromossomos celulares; d) o provírus integrado é transcrito, originando mRNAs para a síntese protéica e para serem incorporados como genoma na progênie viral; e) as etapas iniciais da replicação do genoma ocorrem no citoplasma e são mediadas por enzimas virais (transcritase reversa); f) as etapas seguintes ocorrem no núcleo e são mediadas por enzimas virais (integração = integrase, IN) e celulares (transcrição = RNA pol II celular); g) o genoma dos retrovírus é o único genoma viral sintetizado exclusivamente por enzimas e fatores celulares. Por isso, a sua estrutura é idêntica aos mRNA celulares: possui *cap* na extremidade 5' e é poliadenilado na extremidade 3'. As principais etapas da replicação do genoma dos retrovírus e a estrutura das moléculas intermediárias estão ilustradas na Figura 7.12. Maiores detalhes sobre a expressão gênica e replicação do genoma podem ser encontrados no Capítulo 31.

6 Bibliografia consultada

- ALVAREZ, D.E. et al. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. **Journal of Virology**, v.79, p.6631-6643, 2005.
- BALL, L.A. Replication strategies of RNA viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.5, p.105-118.
- BALVAY, L. et al. Translational control of retroviruses. **Nature Reviews. Microbiology**, v.5, p.128-140, 2007.
- BELSHAM, G.J.; BRAGWYN, J.K. A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. **Journal of Virology**, v.64, p.5389-5395, 1990.
- BISHOP, D.H.L. Arenaviruses have ambisense S RNA. **Medical Microbiology and Immunology**, v.175, p.61-62, 1986.
- BLYN, L.B. et al. Host cell proteins binding to domain IV of the 5' noncoding region of poliovirus RNA. **Journal of Virology**, v.69, p.4381-4389, 1995.
- BRIAN, D.A. et al. Role of subgenomic minus-strand RNA in coronavirus replication (1994). **Archives of Virology**, v.9, p.173-180, 1994.
- BROWN, E.A. et al. The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. **Journal of Virology**, v.65, p.5828-5838, 1991.
- CAI, Z. et al. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. **Journal of Virology**, v.79, p.13963-13973, 2005.
- CHANDRAN, K. et al. Complete in vitro assembly of the reovirus outer capsid produces highly infectious particles suitable for genetic studies of the receptor-binding protein. **Journal of Virology**, v.75, p.5335-5342, 2001.
- CHANOCK, R.M.; MURPHY, B.R.; COLLINS, P.L. Parainfluenza viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.42, p.1341-1379.
- CLYDE, K.; HARRIS, E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. **Journal of Virology**, v.80, p.2170-2182, 2006.
- CORVER, J. et al. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. **Journal of Virology**, v.77, p.2265-2270, 2003.
- DEVANEY, M.A. et al. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the *cap*-binding protein complex. **Journal of Virology**, v.62, p.4407-4409, 1988.
- DORNER, A.J. et al. *In vitro* translation of poliovirus RNA: utilization of internal initiation sites in reticulocyte lysate. **Journal of Virology**, v.50, p.507-514, 1984.
- EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when *cap*-dependent translation is inhibited. **Journal of Virology**, v.80, p.2976-2986, 2006.
- ELTON, D. et al. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. **Journal of Virology**, v.75, p.408-419, 2001.
- ETCHISON, D. et al. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a *cap* binding protein complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.14806-14810, 1982.
- ETCHISON, D.; FOUT, S. Human rhinovirus 14 infection of HeLa cells results in the proteolytic cleavage of the p220 *cap*-binding complex subunit and inactivates globin mRNA translation in vitro. **Journal of Virology**, v.54, p.634-638, 1985.
- FIELDS, B.N.; GREEN, M.I. Genetic and molecular mechanisms of viral pathogenesis: implications for prevention and treatment. **Nature**, v.300, p.19-23 (1982).
- FLINT, S.J. et al. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. Cap.6, p.162-196.
- FREED, E.O. HIV-1 replication. **Somatic cells and molecular genetics**, v.26, p.13-33, 2001.

- GAMARNIK, A.V.; ANDINO, R. Switch from translation to RNA replication in a positive stranded RNA virus. **Genes and Development**, v.12, p.2293-2304, 1998.
- GERBER, K.; WIMMER, E.; PAUL, A.V. Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A pro. **Journal of Virology**, v.75, p.10979-10990, 2001.
- GOFF, S.P. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.57, p.1871-1939.
- GONZALEZ-SCARANO, F.; NATHANSON, N. *Bunyaviridae*. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.48, p.1473-1504.
- GOOGFELLOW, I. et al. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. **Journal of Virology**, v.74, p.4590-4600, 2000.
- HELLEN, C.U.; PESTOVA, T.V.; WIMMER, E. Effect of mutations downstream of the internal ribosome entry site on initiation of poliovirus protein synthesis. **Journal of Virology**, v.68, p.6312-6322, 1994.
- HEROLD, J.; ANDINO, R. Functional circularization of a positive stranded RNA virus: a new model for the initiation of negative strand RNA synthesis. In: MEETING OF THE EUROPEAN STUDY GROUP ON THE MOLECULAR BIOLOGY OF PICORNAVIRUSES, 11. Gargano, Italy, May 2000. **Proceedings...** [S.I.]: Europic 2000. Abstract G09.
- JANG, S.K. et al. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. **Journal of Virology**, v.62, p.2636-2643, 1988.
- JAY, M.T.; GLASER, C.; FULHORST, C.F. The arenaviruses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, p.904-915, 2005.
- JURGENS, C.K. et al. 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. **Virology**, v.345, p.346-357, 2006.
- KOBAYASHI, T. et al. Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference. **Journal of Virology**, v.80, p.9053-9063, 2006.
- LAMB, R.A.; KOLAKOSKY, D. *Paramyxoviridae*: The viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.41, p.1305-1340.
- LAMB, R.A.; KRUG, R.M. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.46, p.1487-1531.
- LOPEZ DE QUINTO, S.; LAFUENTE, E.; MARTÍNEZ-SALAS, E. IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. **RNA**, v.7, p.1213-1226, 2001.
- MARTIN, A.; STAEHEL, P.; SCHNEIDER, U. RNA polymerase II-controlled expression of antigenomic RNA enhances the rescue efficacies of two different members of the Mononegavirales independently of the site of viral genome replication. **Journal of Virology**, v.80, p.5708-5715, 2006.
- MASON, P.W.; BEZBOROVA, S.V.; HENRY, T.M. Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. **Journal of Virology**, v.76, p.9686-9694, 2002.
- MIR, M.A.; PANGANIBAN, A.T. Characterization of the RNA chaperone activity of hantavirus nucleocapsid protein. **Journal of Virology**, v.80, p.6276-6285, 2006.
- MOLLA, A.; PAUL, A.V.; WIMMER, E. Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. **Science**, v.254, p.1647-1651, 1991.
- MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. Cap.31, p.469-483.
- NAYAK, D.P.; HUI, E.K.; BARMAN, S. Assembly and budding of influenza virus. **Virus Research**, v.106, p.147-165, 2004.
- NIBERT, M.L.; SCHIFF, L.A. Reoviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.52, p.1679-1728.
- PAUL, A.V. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In: SEMLER, B.L.; WIMMER, E. (Ed). **Molecular biology of picornaviruses**. Washington, D.C.: ASM Press, 2002. p.227-246.
- PELLETIER, J.; SONENBERG, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. **Nature**, v.334, p.320-325, 1988.
- PESTOVA, T.V.; HELLEN, C.U.T.; SHATSKY, I.N. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. **Molecular and Cellular Biology**, v.16, p.6859-6869, 1996.
- PICCONE, M.E. et al. Expression in Escherichia coli and purification of biologically active L proteinase of foot-and-mouth disease virus. **Virus Research**, v.35, p.263-275, 1995.
- PLYUSNIN, A.; VAPALAHTI, O.; VAHERI, A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. **The Journal of General Virology**, v.77, p.2677-2687, 1996.
- RONG, S. Characterization of a highly virulent feline calicivirus and attenuation of this virus. **Virus Research**, v.122, p.95-108, 2006.
- ROSE, J.K.; WHITT, M.A. *Rhabdoviridae*: The viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields**

- virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.38, p.1221-1244.
- RUST, R.C. et al. Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. **Journal of Virology**, v.75, p.9808-9818, 2001.
- SANCHEZ, A. et al. *Filoviridae*: marburg and ebola viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.40, p.1279-1304.
- SCHMALJOHN, C.S.; HOOPER, J.W. *Bunyaviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.48, p.1581-1602.
- SCHNEIDER, U. Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus. **Virus Research**, v.111, p.148-160, 2005.
- SCHROEDER, R.; BARTA, A.; SEMRAD, K. Strategies for RNA folding and assembly. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v.5, p. 908-919, 2004.
- SOUTHERN, P.J. *Arenaviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.49, p.1505-1519.
- STASSINOPOULOS, I.A.; BELSHAM, G.J. A novel protein RNA binding assay: functional interactions of the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site with cellular proteins. **RNA**, v.7, p.114-122, 2001.
- SVITKIN, Y.V. et al. Complete translation of the hepatitis C virus genome in vitro: membranes play a critical role in the maturation of all virus proteins except for NS3. **Journal of Virology**, v.79, p.6868-6881, 2005.
- SVITKIN, Y.V.; SONENBERG, N. Cell-free synthesis of encephalomyocarditis virus. **Journal of Virology**, v.77, p.6551-6555, 2003.
- SVITKIN, Y.V. et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between *cap*-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, p.10556-10565, 2005.
- THIEL, V. et al. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. **The Journal of General Virology**, v.84, p.2305-2315, 2003.
- TILGNER, M.; DEAS, T.S.; SHI, P.Y. The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. **Virology**, v.331, p.375-386, 2005.
- TODD, S.; TOWNER, J.S.; SEMLER, B.L. Translation and replication properties of the human rhinovirus genome in vivo and in vitro. **Virology**, v.229, p.90-97, 1997.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K. et al. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. **Journal of Virology**, v.66, p.1476-1483, 1992.
- VANOOIJ, M.J.M. et al. Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 CRE(2C): role of CRE(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. **The Journal of General Virology**, v.87, p.103-113, 2006.
- YE, J. et al. Molecular pathology in the lungs of severe acute respiratory syndrome patients. **The American Journal of Pathology**, v.170, p.538-545, 2007.
- YU, H.; GRASSMANN, C.W.; BEHRENS, E. Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. **Journal of Virology**, v.73, p.3638-3648, 1999.

PATOGENIA DAS INFECÇÕES VÍRICAS

Eduardo Furtado Flores¹

8

1 Introdução	191
1.1 Conceitos básicos	191
2 Patologia em nível celular	193
2.1 Interações dos vírus com as células	193
2.2 Efeitos da replicação viral nas células hospedeiras	196
2.3 Apoptose por vírus	196
3 Patogenia em nível de hospedeiro	197
3.1 Penetração e replicação primária	197
3.1.1 Pele e mucosas superficiais	197
3.1.2 Trato respiratório	199
3.1.3 Orofaringe e trato digestivo	200
3.1.4 Mucosa urogenital	201
3.2 Infecções localizadas <i>versus</i> infecções disseminadas (ou sistêmicas)	202
3.2.1 Disseminação local	202
3.2.2 Disseminação hematógena	202
3.2.3 Disseminação nervosa	207
3.3 Localização das infecções	209
3.3.1 Infecções em órgãos e sistemas específicos	209
3.3.2 Infecções da pele e tegumento	211
3.3.3 Infecções do trato respiratório	212
3.3.4 Infecções do trato digestivo	213
3.3.5 Infecções do sistema nervoso central	215
3.3.6 Infecções do sistema linforreticular e hematopoiético	217
3.3.7 Infecção fetal	218
4 Padrões principais de infecção	220
4.1 Infecções agudas	221

¹ Colaboraram em seções específicas: Janice Ciacci Zanella (Apoptose por vírus); Luiz Carlos Kreutz (Padrões principais de infecção) e Mariana Sá e Silva (Imunopatologia em infecções víricas).

4.2 Infecções persistentes (ou crônicas)	212
4.2.1 Infecções latentes	222
4.2.2 Infecções persistentes ou crônicas	222
4.2.3 Infecções persistentes temporárias	223
4.3 Mecanismos envolvidos na manutenção das infecções persistentes	225
4.3.1 Restrição do efeito citopatogênico	225
4.3.2 Infecção de células semipermissivas	225
4.3.3 Infecção de um pequeno número de células	226
4.3.4 Manutenção do genoma viral nas células hospedeiras	226
4.3.5 Evasão da resposta imune do hospedeiro	226
5 Oncogênese por vírus	226
5.1 Oncogênese por retrovírus	226
5.2 Pequenos vírus DNA tumorigênicos	227
6 Imunopatologia em infecções víricas	228
6.1 Imunopatologia mediada por imunocomplexos	229
6.2 Imunopatologia mediada por linfócitos T citotóxicos	230
6.3 Imunopatologia por indução de auto-imunidade	230
7 Imunossupressão por vírus	230
7.1 Replicação viral em células envolvidas na resposta imunológica	231
7.2 Imunossupressão associada com a ativação do sistema imune	232
7.3 Produtos de monócitos e linfócitos ativados	232
7.4 Proteínas virais	232
8 Bibliografia consultada	234

1 Introdução

O termo patogenicidade – ou patogênese –, aplicado às infecções víricas, refere-se ao conjunto de mecanismos pelos quais os vírus produzem doença em seus hospedeiros (pato = doença, gênese = origem, produção). A definição de doença como sendo qualquer manifestação resultante de alterações da fisiologia do organismo abrange um leque muito amplo de condições. Manifestações patológicas incluem desde aumentos leves da temperatura corporal, alterações de ânimo e apetite, até condições severas que, eventualmente, resultam na morte do hospedeiro. Na maioria das doenças, a patogenicidade é multifatorial, resultante da alteração de fatores endógenos ou exógenos, raramente determinadas por um fator único. Com as infecções víricas não é diferente, pois as consequências dependem das interações entre inúmeros fatores do agente e do hospedeiro.

Grande parte dos sinais clínicos observados nas doenças víricas é consequência da resposta do hospedeiro à injúria celular e tecidual. Por sua vez, essa injúria pode resultar de efeitos diretos ou indiretos da replicação viral ou pode, ainda, ser consequência da resposta imune do hospedeiro contra as células infectadas. De fato, a patogenicidade de várias doenças víricas está mais intimamente ligada aos mecanismos imunológicos do hospedeiro do que às consequências diretas da replicação viral nos tecidos. Em resumo, a patogenicidade das infecções víricas é determinada pela combinação entre os efeitos diretos e indiretos da replicação viral e as respostas do hospedeiro à infecção.

Os mecanismos pelos quais os vírus produzem doenças em seus hospedeiros podem ser examinados em diferentes níveis. As células são as unidades fundamentais do organismo, nas quais os vírus se multiplicam. Por isso, as células se constituem nos locais de origem dos eventos ligados à infecção vírica que podem resultar em doença. A replicação dos vírus, muitas vezes, interfere com mecanismos fisiológicos essenciais da célula hospedeira, alterando as suas funções em benefício da replicação viral. A alteração de processos celulares envolvidos na biossíntese de macromoléculas e na manutenção da homeostase celular, por exemplo, podem resultar em disfun-

ção e até morte celular. Outras vezes, produtos da replicação viral podem ser tóxicos para a célula hospedeira. Essas alterações estão frequentemente envolvidas na origem de processos patológicos observados no organismo. Uma infecção pode resultar em absoluta ausência de efeitos deletérios sobre as células e, conseqüentemente, na ausência de manifestações clínicas; ou pode resultar em efeitos celulares graves, acompanhados de sinais clínicos severos e morte do hospedeiro.

No hospedeiro, a complexidade de interações que pode – ou não – resultar em doença é muito maior, e é ainda acrescida da participação dos componentes celulares e humorais da resposta imunológica e de outros sistemas encarregados de manter a homeostasia e integridade do organismo. Ao contrário do que se imagina, a ocorrência de doença clínica em infecções víricas é um evento pouco freqüente, considerando-se a totalidade das infecções. Ou seja, a maioria das infecções por vírus não resulta em alterações orgânicas que se manifestem com sinais perceptíveis clinicamente. A ocorrência ou não de doença em uma determinada infecção vírica depende da interação entre inúmeros fatores do agente e do hospedeiro, na qual os mecanismos imunológicos, destinados a manter a integridade e funcionalidade do organismo, desempenham um papel fundamental. A Figura 8.1 ilustra esquematicamente a relação entre infecção e doença em nível celular e de hospedeiro, com as consequências derivadas da replicação nos diferentes níveis.

1.1 Conceitos básicos

O termo *patogenicidade* se refere à capacidade de um determinado agente produzir doença no hospedeiro. Vírus altamente patogênicos são aqueles capazes de produzir doença em uma grande parcela dos hospedeiros infectados. Como a patogenicidade das infecções depende também das reações do organismo, a patogenicidade de um vírus é modulada por suas interações com o hospedeiro. O termo *virulência*, muitas vezes utilizado como sinônimo de patogenicidade, se refere ao nível de severidade da doença causada por um agente. Os vírus altamente virulentos causam doença grave; enquanto vírus avirulentos ou pouco virulentos (atenuados) não causam

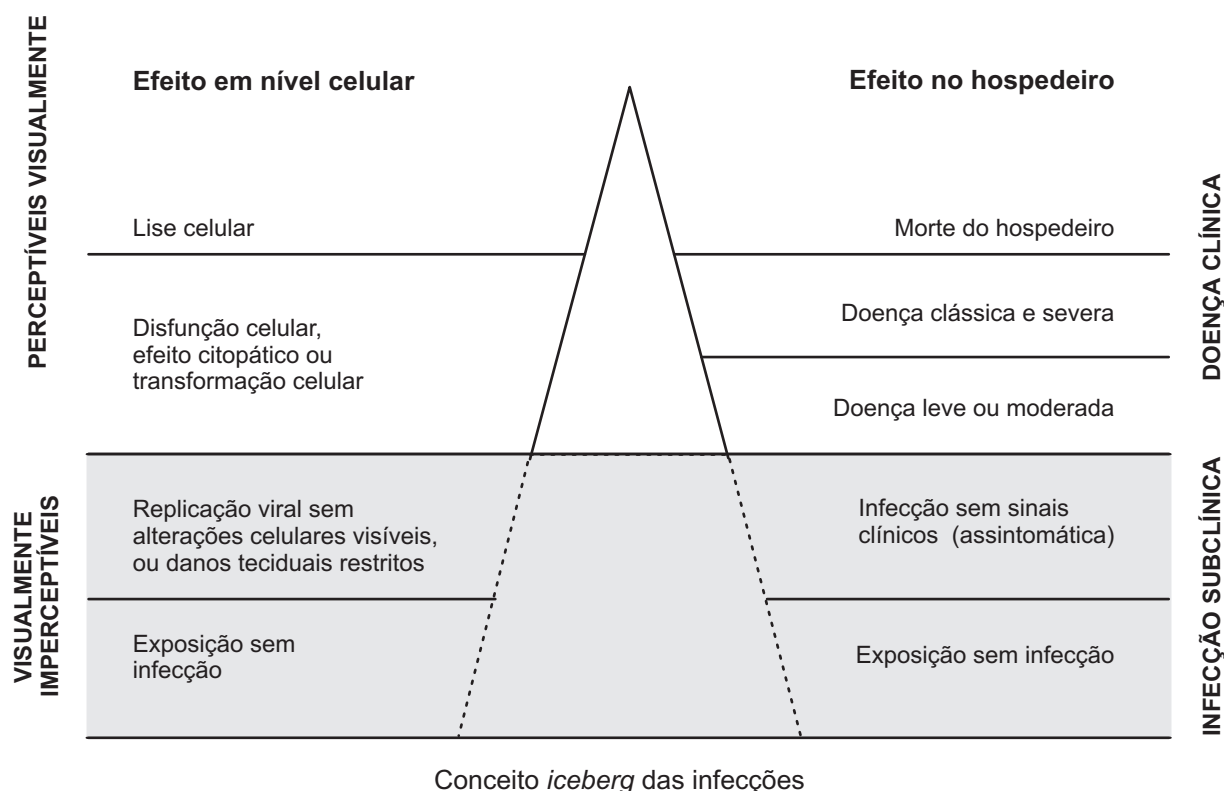


Figura 8.1. O conceito iceberg das infecções víricas. Note que a maioria das infecções víricas não resulta em efeitos perceptíveis em nível de hospedeiro. As manifestações clínicas, quando ocorrem, constituem-se em reflexos da disfunção e patologia em nível celular e tecidual.

doença, ou causam doença leve, respectivamente. A virulência de um vírus pode ser medida de várias formas, incluindo o percentual de animais que adoecem ou morrem após inoculação experimental, grau de severidade dos sinais clínicos, nível e intensidade de alterações histológicas, entre outras.

A virulência dos vírus é determinada geneticamente e pode variar entre isolados de uma mesma espécie viral. No entanto, fatores do hospedeiro podem interferir com e modular a virulência desses agentes. Embora em alguns vírus a virulência possa ser mapeada em um ou poucos genes, para a maioria dos vírus essa é uma característica multifatorial. Em geral, os genes virais envolvidos na virulência podem ser divididos em quatro classes: a) genes cujos produtos afetam a capacidade replicativa do vírus; b) produtos gênicos que influenciam a capacidade do vírus de se disseminar no hospedeiro; c) produtos virais que se contrapõem à resposta imunológica do hospedeiro e d) produtos virais tóxicos para a célula

e/ou hospedeiro. Muitos genes virais podem se enquadrar em mais de uma classe, afetando a virulência de mais de uma forma.

A identificação dos genes envolvidos na determinação da virulência dos vírus de importância em saúde humana e animal é um dos maiores desafios da Virologia, pois pode permitir a manipulação genética desses agentes com fins vacinais e/ou terapêuticos. No entanto, essa nem sempre é uma tarefa fácil, pela complexidade das interações vírus-célula, falta de sistemas apropriados ou modelos animais adequados e pela dificuldade de se estudar virulência em cultivos celulares.

O termo *susceptibilidade* se refere às condições oferecidas pelo hospedeiro para a ocorrência da infecção e doença. Por outro lado, *resistência* é a oposição oferecida pelo hospedeiro à instalação da infecção. A susceptibilidade e resistência de um hospedeiro a um vírus são determinadas geneticamente e podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie, de acordo com fatores como: raça, idade, sexo, condição corporal, estado fisiológico.

lógico etc. A resistência à infecção pode ser devida a mecanismos naturais (resistência natural ou inata) ou adquiridos (resistência adquirida). O termo *imunidade* é muito utilizado para designar a resistência, principalmente a resistência adquirida. O termo *refratariedade* se refere a um grau de resistência absoluta a um determinado agente, e é uma característica da espécie animal, e não do indivíduo.

O *tropismo* é a predileção de um vírus por determinadas células ou tecidos e pode ser determinado por uma variedade de fatores celulares que são necessários para a replicação viral. O principal fator determinante do tropismo e que possui influência direta no padrão de distribuição e localização das infecções é a presença de receptores específicos para o vírus. Maiores detalhes sobre os mecanismos envolvidos com o tropismo celular dos vírus serão abordados ao longo do texto.

2 Patologia em nível celular

A compreensão da patogenia das doenças víricas depende do conhecimento dos mecanismos envolvidos em diferentes níveis. Os vírus necessitam das macromoléculas e de processos biossintéticos da célula hospedeira para se multiplicar. As interações entre o vírus e os componentes celulares são complexas e, muitas vezes, resultam em alterações da fisiologia celular, podendo levar à injúria e até mesmo à morte da célula. As patologias celulares associadas com a replicação viral se constituem em um dos principais mecanismos de produção das doenças. Em nível celular, as infecções víricas podem resultar em uma variedade de condições, a saber: a) infecção não-produtiva, com bloqueio em uma das etapas intracelulares da replicação, seguida ou não de injúria e morte celular; b) estabelecimento de infecção latente, com limitada expressão gênica viral e persistência do genoma viral na célula hospedeira; c) infecção produtiva, com produção de progênie viral infecciosa, acompanhada de patologia ou morte celular; d) infecção produtiva persistente, em que a célula sobrevive e segue produzindo vírus em níveis baixos por longos períodos e, até mesmo, indefinidamente; e) oncogênese, seja pela incorporação de oncoge-

nes virais na célula hospedeira ou por alterações nas funções de genes celulares encarregados do controle do ciclo celular.

2.1 Interações dos vírus com as células

A maioria das alterações da fisiologia celular resultantes da replicação viral se deve a efeitos secundários das interações entre os produtos virais e componentes celulares; interações estas que são necessárias para a multiplicação dos vírus. Os efeitos tóxicos específicos de alguns produtos virais e o acúmulo excessivo de proteínas e ácidos nucleicos virais também podem levar à injúria celular.

As interações que resultam em alteração na fisiologia celular podem ocorrer em qualquer etapa do ciclo replicativo. A penetração dos adenovírus em células de cultivo é acompanhada por despreendimento das células da superfície de contato. Esse evento deve-se à ligação da proteína penton dos vírions às moléculas de integrinas da membrana das células. Essa ligação altera as interações das integrinas com outras proteínas da membrana celular, necessárias para a aderência das células à superfície do frasco. A proteína M2 dos vírus da influenza produz canais iônicos na membrana dos endossomos durante o processo de internalização do vírus, através dos quais prótons H^+ penetram para o interior das vesículas endossômicas, acidificando o pH e facilitando o processo de fusão/penetração e desnudamento do nucleocapsídeo. No entanto, as possíveis consequências desse evento, para a fisiologia celular, são desconhecidas.

Alguns vírus interferem com os mecanismos de transcrição, processamento (*splicing*) e transporte de RNA mensageiros (mRNA) celulares, estratégias que visam a favorecer a tradução dos mRNA virais. Os adenovírus e herpesvírus inibem a maturação e a exportação de mRNA celulares para o citoplasma; os vírus da influenza provocam a clivagem de mRNA celulares para utilizar a extremidade 5' com *cap* para os seus mRNA. Produtos dos vírus da influenza, herpesvírus e poxvírus promovem a degradação de mRNA celulares (Tabela 8.1).

Outros vírus alteram a especificidade ou subvertem a maquinaria celular de tradução

Tabela 8.1. Proteínas virais responsáveis por efeitos específicos sobre mecanismos e estruturas das células hospedeiras

Vírus	Proteína(s)	Efeito	Alvo
Poliovírus	2A ^{pro}	Inibição da tradução cap-dependente	eIF-4G
	2A, 3A	Inibição do tráfego protéico RER-Golgi	Desconhecido
	2B, 2C	Proliferação de vesículas membranosas	Desconhecido
	Desconhecida	Alteração do mecanismo da MAP4	MAP4
	3C	Inibição da transcrição	Tbp, Complexo Tfflc
Vírus Sindbis	Desconhecida	Aumento da permeabilidade da membrana plasmática	Na, K-ATPase?
Paramixovírus	F	Fusão entre células – formação de sincícios	Membrana plasmática
Adenovírus	E1B-55K, E4-34K	Bloqueio na acumulação de mRNAs celulares no citoplasma	Proteína celular envolvida no transporte de mRNA
	Desconhecida	Inibição da tradução cap-dependente	eIF-4E
Herpesvírus	Produto do gene <i>vhs</i> (ribonuclease)	Desmontagem dos polissomas	mRNA celular
Vírus do herpes simplex	ICP 27	Inibição do transporte e processamento de mRNA celular	Desconhecido
Vários vírus	Desconhecida	Despolimerização do citoesqueleto	Filamentos de actina.
Fonte: adaptada de Flint et al. (2000).			

para a produção de suas proteínas, em detrimento das proteínas celulares. A inibição da tradução de mRNA celulares, e não de mRNA virais, é uma forma de subversão utilizada pelos vírus para favorecer a síntese de suas proteínas. Esses mecanismos são utilizados por vários vírus, incluindo o vírus da estomatite vesicular (VSV), o poliovírus, o vírus da febre aftosa (FMDV), os adenovírus, entre outros. Essa interferência pode ter efeitos deletérios para a célula hospedeira, que tem a sua síntese protéica reduzida ou mesmo suprimida.

A inibição da síntese de DNA celular é outro mecanismo utilizado por vírus RNA e DNA durante a sua replicação. Essa inibição pode proporcionar uma disponibilidade maior de precursores (nucleotídeos), proteínas e estruturas celulares para a síntese dos ácidos nucléicos virais e replicação do genoma. É possível também que a inibição da síntese de DNA celular, em alguns casos, seja uma mera consequência da inibição da síntese protéica da célula hospedeira pelo vírus.

Por outro lado, alguns vírus (poliomavírus, papilomavírus e adenovírus) estimulam as células a entrar em fase S, com ativação da síntese de DNA e subsequente divisão celular. Essa estratégia tem por fim estimular a célula a fornecer condições e componentes (nucleotídeos, enzimas replicativas e fatores de replicação) necessários à replicação do genoma viral. Como consequência, a célula hospedeira passa a oferecer as condições necessárias à replicação viral. Essa interferência com a regulação do ciclo celular, algumas vezes, pode levar à transformação tumoral dessas células.

A apoptose – ou morte celular programada – é um mecanismo de morte celular em resposta a vários estímulos, inclusive infecções víricas. Tem sido demonstrado que vários vírus são capazes de desencadear a cascata de reações que leva à apoptose da célula hospedeira. Por outro lado, vários vírus possuem produtos que inibem ou retardam a apoptose, prolongando, assim, a vida da célula e permitindo a conclusão do seu ciclo replicativo.

Proteínas virais podem também interferir com mecanismos celulares de modificação, localização e maturação de proteínas, podendo resultar em citopatologia. As glicoproteínas do envelope, em especial, são alvos de extensivas modificações pós-tradução, maturação e transporte por mecanismos celulares, e a sua abundância pode interferir com os processos celulares de processamento de proteínas endógenas.

A alteração da estrutura de membranas celulares, resultando em fusão e/ou alteração da permeabilidade, também são efeitos da replicação de vários vírus. Diversos vírus com envelope possuem glicoproteínas que são necessárias para promover a fusão do envelope com a membrana celular, permitindo a sua penetração na célula hospedeira. A expressão dessas proteínas em células infectadas pode resultar em fusão entre células vizinhas, resultando na formação de massas citoplasmáticas multinucleadas denominadas sincícios. A fusão entre células vizinhas também é possível pela ação direta das glicoproteínas virais no processo de penetração. A fusão celular é uma forma de citopatologia produzida por vírus, mas também pode ser considerada uma forma de disseminação do vírus entre células.

Os produtos de alguns vírus produzem um aumento na permeabilidade da membrana plasmática da célula infectada. Em decorrência disso, o aumento da concentração de íons sódio na célula pode favorecer a tradução de mRNA virais. Então, para alguns vírus, o aumento da permeabilidade da membrana pode favorecer a síntese preferencial de proteínas virais.

A infecção por diversos vírus pode provocar a desorganização ou mesmo a ruptura do citoesqueleto da célula hospedeira. Uma redução na quantidade de filamentos de actina tem sido observada na infecção por vários vírus, incluindo o vírus do herpes simplex humano (HSV), vírus da cinomose (CDV) e VSV, entre outros. As consequências da desorganização do citoesqueleto não são bem claras, mas provavelmente possuem relação com algumas alterações morfológicas observadas em células infectadas. É provável que as alterações na estrutura e função do citoesqueleto sejam efeitos secundários da replicação viral e da interferência do vírus com outras funções celulares.

A replicação de alguns vírus resulta na formação de estruturas com morfologia mais ou menos definidas no citoplasma ou no núcleo da célula infectada. Essas estruturas são denominadas genericamente “corpúsculos de inclusão” e são formadas pelo acúmulo de complexos de transcrição e replicação, produtos intermediários da replicação, proteínas estruturais e não-estruturais, capsídeos, nucleocapsídeos e vírions em determinados locais da célula. A localização dos corpúsculos de inclusão reflete o local de replicação do respectivo vírus. Os corpúsculos de Negri são formados no citoplasma de neurônios infectados pelo vírus da raiva; os corpúsculos citoplasmáticos de Lenz são característicos da infecção pelo CDV. A replicação dos reovírus é acompanhada da formação de grandes estruturas citoplasmáticas denominadas virossomos, que podem ocupar grande parte do citoplasma. Os virossomos são os locais de acúmulo de ácidos nucleicos e proteínas virais e onde ocorrem os mecanismos de replicação do genoma e montagem das partículas víricas. A replicação dos herpesvírus neuropatogênicos (herpesvírus bovino tipo 5 [BoHV-5], vírus da doença de Aujeszky [PRV]) resulta na formação de corpúsculos nucleares em neurônios do sistema nervoso central (SNC). A presença de corpúsculos de inclusão tem sido utilizada no diagnóstico histopatológico de algumas viroses, pela facilidade de observação e pelas suas características tintoriais (podem ser basofílicos ou acidofílicos).

Pelo exposto, fica evidente que as interações entre os produtos virais e os componentes celulares, durante o ciclo replicativo dos vírus, são extremamente complexas e podem resultar em uma variedade de alterações da fisiologia celular. Grande parte dessas alterações foi investigada e caracterizada em células de cultivo. Conseqüentemente as informações provenientes desses estudos devem ser analisadas com cautela. Não obstante, é possível que grande parte das alterações observadas *in vitro* ocorra também *in vivo*. É provável também que as interações entre os vírus e as células hospedeiras sejam ainda mais complexas no animal, pela participação de componentes orgânicos ausentes nos frascos de cultivo. Nesse sentido, os componentes celulares e humorais do sistema imunológico (citocinas e anticorpos) de

outros sistemas de defesa – e também do sistema endócrino do hospedeiro – certamente possuem participação importante nas interações dos hospedeiros com esses agentes invasores. Exemplos de proteínas virais que interferem com mecanismos específicos das células hospedeiras estão apresentados na Tabela 8.1.

2.2 Efeitos da replicação viral nas células hospedeiras

A replicação dos vírus nas células hospedeiras freqüentemente resulta em alterações na fisiologia celular, tanto pela interferência com processos metabólicos e estruturas celulares quanto pela ação tóxica de produtos da replicação viral. Em particular, a interferência com a síntese de macromoléculas pode afetar negativamente a fisiologia celular e, freqüentemente, resulta em patologia. Essas alterações podem ser detectadas visual ou bioquimicamente e tem sido mais caracterizadas em células de cultivo. As alterações morfológicas, associadas com a replicação de vírus em células de cultivo, são denominadas coletivamente de efeito citopático ou citopatogênico (ECP).

Como cada grupo de vírus pode afetar funções e mecanismos celulares diferentes, o tipo de ECP produzido também é característico de cada espécie ou grupo de vírus. A patologia mais extrema é a *lise* ou destruição celular, e os vírus que a induzem são denominados *citolíticos*. A lise celular é caracterizada pela morte e desintegração celular, freqüentemente devida à absorção excessiva de líquido extracelular. Alguns vírus produzem alterações morfológicas, como *citomegalia* ou *arredondamento* celular. A citomegalia pode ser devida à absorção de líquido, enquanto o arredondamento é geralmente consequência de alterações na estrutura e função das fibras do citoesqueleto. Alterações no citoesqueleto também resultam em *desprendimento* das células do substrato, efeito que pode ocorrer em estágios avançados de patologia celular, por mecanismos diversos. Os vírus que possuem glicoproteínas fusogênicas no envelope promovem fusão celular, com a formação de células gigantes multinucleadas, denominadas *sincícios*. Células fusiona-

das possuem vida curta e eventualmente sofrem lise. A formação de *vacúolos* é outro tipo de ECP produzido por vírus que replicam no citoplasma. *Corpúsculos de inclusão* citoplasmáticos ou nucleares também são formados como resultado da replicação de alguns vírus e podem ser observados sob microscopia ótica.

Embora a lise celular seja o mecanismo mais atraente e fácil para explicar as patologias induzidas pelos vírus nos seus hospedeiros, certamente não se constitui no único mecanismo responsável pela produção das doenças. Vírus não citolíticos também podem causar patologias severas e até a morte do hospedeiro. Nesse sentido, é provável que outras formas de citopatologia – que não necessariamente a lise celular – também possam ser responsáveis por patologias observadas em animais doentes. Acredita-se que grande parte das patologias observadas em doenças causadas por vírus não-citopáticos sejam consequências da resposta imune do hospedeiro.

2.3 Apoptose por vírus

Apoptose ou morte celular programada é um processo bioquímico que funciona como uma cascata que leva a morte ou “suicídio celular”. Esse mecanismo ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário e fetal, manutenção da imunidade e da homeostase em organismos multinucleados. Muitos vírus interferem no processo de apoptose da célula hospedeira, alterando reações e componentes-chave desse processo. Produtos de diferentes vírus promovem ou inibem a apoptose através de diversos mecanismos de ação. É óbvio que os vírus se beneficiam ao evitar a apoptose, pois isso permite a sobrevivência da célula até que o ciclo replicativo seja concluído. Porém, em alguns casos, a ocorrência de apoptose é vantajosa para o vírus. Em tais casos, a formação de corpos apoptóticos, contendo vírus, resulta em fagocitose dessas estruturas e liberação do vírus no fluido extracelular, o que favorece a sua disseminação.

Os adenovírus, vírus da peste suína africana (ASFV), vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e os vírus da peste suína clássica (CSFV)

são exemplos de vírus que produzem proteínas indutoras da apoptose. Proteínas que inibem a apoptose também são produzidas pelos adenovírus e ASFV e pelos vírus da vaccinia, herpesvírus bovino tipo-4 (BoHV-4), herpesvírus equino (EHV), vírus da doença de Marek, dentre outros.

3 Patogenia em nível de hospedeiro

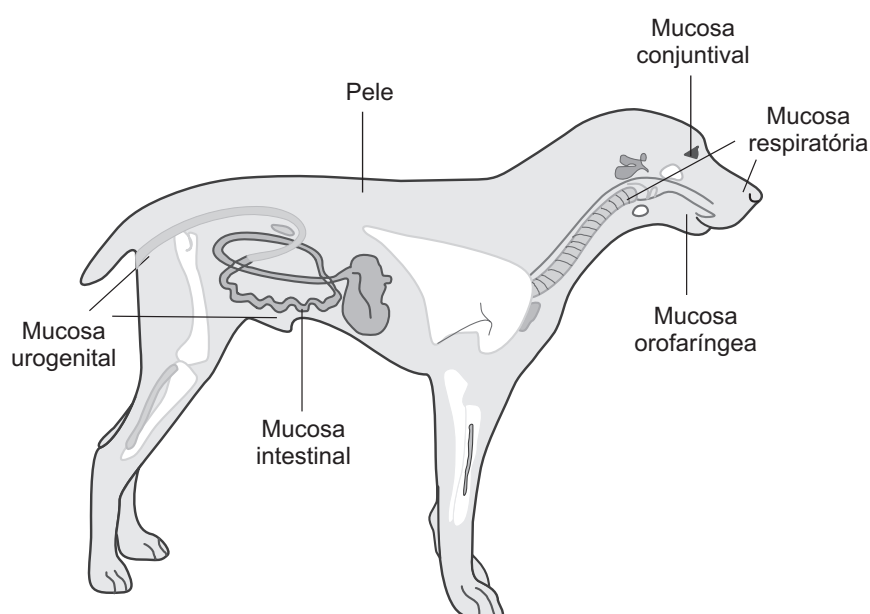
O resultado de uma infecção vírica de hospedeiro depende de vários fatores, a saber: a) capacidade de o vírus penetrar em um hospedeiro susceptível pela via adequada; b) realizar uma replicação primária em tecidos próximos ao local de entrada; c) escapar dos mecanismos naturais de defesa do organismo; d) disseminar-se para os tecidos e órgãos-alvo; e) replicar eficientemente nesses tecidos e f) produzir ou não injúria tecidual (provocar patologia). Embora os vírus apresentem uma diversidade muito grande e participem de interações de especificidade e complexidade diferentes com os seus hospedeiros, algumas etapas da patogenia parecem ser comuns à maioria das infecções víricas. A seguir, serão abordadas essas etapas.

3.1 Penetração e replicação primária

O estabelecimento da infecção no hospedeiro depende da penetração e replicação do vírus em células próximas aos locais de entrada. Essa replicação – denominada primária – é necessária para a amplificação do agente, de modo a superar as barreiras impostas pela resposta inata do hospedeiro. A replicação primária geralmente ocorre no próprio local de penetração, em tecidos próximos ou nos linfonodos regionais. Em geral, os vírus podem utilizar mais de uma via para penetrar nos seus hospedeiros. As principais vias de penetração de vírus nos animais serão apresentadas a seguir e estão ilustradas na Figura 8.2.

3.1.1 Pele e mucosas superficiais

A pele se constitui em uma importante barreira para a penetração de vírus, pois a sua camada externa é formada por células mortas e não suporta a replicação viral. Além disso, a sua superfície é seca, levemente ácida e possui uma flora bacteriana permanente/residente que atua como uma barreira natural. No entanto, solu-



Fonte: www.bakerinstitute.vet.cornell.edu.

Figura 8.2. Vias de penetração de vírus em seus hospedeiros.

ções de continuidade – mesmo imperceptíveis – provocadas por abrasões, pequenas incisões ou puncturas podem permitir a penetração e instalação de vários vírus. Dentre os vírus que podem penetrar através da pele semi-integra incluem-se os papilomavírus, alguns poxvírus e herpesvírus (Tabela 8.2). Esses vírus são geralmente transmitidos por contato direto ou indireto, ou também mecanicamente através de insetos. Se a penetração for superficial, a replicação é geralmente limitada ao sítio de penetração, pois a epiderme é desprovida de vasos sanguíneos e linfáticos que poderiam servir para disseminar a infecção. No entanto, a infecção de camadas mais profundas da derme pode levar à disseminação sanguínea, pois essa camada é altamente vascularizada (Figura 8.3A). Em especial, os vírus que são transmitidos por insetos hematófagos (alfavírus, flavi-

vírus, buniavírus, alguns rabdovírus e orbivírus) ou por procedimentos iatrogênicos (retrovírus e hepadnavírus) podem alcançar as camadas mais internas e encontrar condições propícias para a sua replicação primária. A abundância de vasos sanguíneos e linfáticos na derme e em camadas mais internas oferece condições para a disseminação desses agentes a partir do sítio primário de replicação. Após a replicação primária no tecido dérmico ou subdérmico, os vírions podem se disseminar para os linfonodos regionais no interior de células fagocíticas ou livres na linfa e/ou sangue. Os herpesvírus invadem terminações nervosas localizadas nesses locais e são transportados ao longo dos axônios ou dentritos até o corpo dos neurônios. O transporte dos herpesvírus por fibras nervosas será abordado na seção 3.2.3.

Tabela 8.2. Vírus animais que penetram no hospedeiro através da pele ou de superfícies mucosas

Via de penetração	Vírus
Pequenas lesões (puncturas, abrasões)	<ul style="list-style-type: none"> – Papilomavírus de várias espécies; – Herpesvírus de várias espécies; – Poxvírus de bovinos, suínos e ovinos; vírus da estomatite papular bovina; poxvírus aviários; – Vírus da doença vesicular de suínos; – Vírus da estomatite vesicular (VSV).
Picada de insetos (transmissão mecânica)	<ul style="list-style-type: none"> – Vários poxvírus (mixomavírus, poxvírus suíno, poxvírus aviários); – Alguns retrovírus (vírus da anemia infecciosa equina [EIAV], vírus da leucose bovina [BLV]); – VSV.
Picada de insetos (transmissão biológica)	<ul style="list-style-type: none"> – Vírus da peste suína africana (ASFV); – Vírus da língua azul (BTV); – VSV, outros rabdovírus; – Vírus da febre do vale Rift (RVFV), outros buniavírus; – Todos os alfavírus; – Vírus do gênero flavivírus.
Mordeduras de vertebrados	<ul style="list-style-type: none"> – Vírus da imunodeficiência felina (FIV); – Vírus da raiva (RabV); – Arenavírus (entre roedores); – Herpesvírus símio B.
Transmissão iatrogênica	<ul style="list-style-type: none"> – Papilomavírus de várias espécies animais; – Retrovírus (BLV, EIAV); – Vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da peste suína clássica (CSFV).
Contato com a conjuntiva	<ul style="list-style-type: none"> – Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), herpesvírus equino 1 (EHV-1); – Adenovírus canino tipos 1 e 2 (CAV-1, CAV-2).

Fonte: adaptada de Murphy et al. (1999).

Aparentemente, as membranas mucosas superficiais poderiam se constituir em uma barreira menos eficiente para impedir a penetração viral. Ainda assim, são recobertas por uma camada de muco que, pela sua natureza viscosa e pela presença de IgA, pode dificultar a penetração dos vírus. Os herpesvírus parecem ser capazes de penetrar em mucosas intactas para iniciar a infecção, embora a ocorrência de lesões certamente favoreça a instalação da infecção.

Determinados vírus são introduzidos através da pele diretamente no tecido subcutâneo ou mesmo no tecido muscular. O vírus da raiva é inoculado profundamente pela mordedura de animais infectados; os arenavírus também são transmitidos entre os roedores silvestres através de mordidas; o herpesvírus símio B e o vírus da imunodeficiência felina (FIV) também podem ser transmitidos por mordeduras. Essa inoculação profunda facilita ainda mais a replicação primária e o estabelecimento da infecção.

Alguns vírus penetram no organismo pela mucosa conjuntival e podem estar associados com conjuntivite ou com infecções sistêmicas. Os adenovírus caninos tipos 1 e 2 (CA_{AdV}-1; CA_{AdV}-2) podem penetrar por essa via; o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pode causar conjuntivite pela infecção direta da conjuntiva ou por contaminação a partir da cavidade nasal.

Os principais vírus de animais que penetram nos seus hospedeiros através da pele e mucosas superficiais estão apresentados na Tabela 8.2.

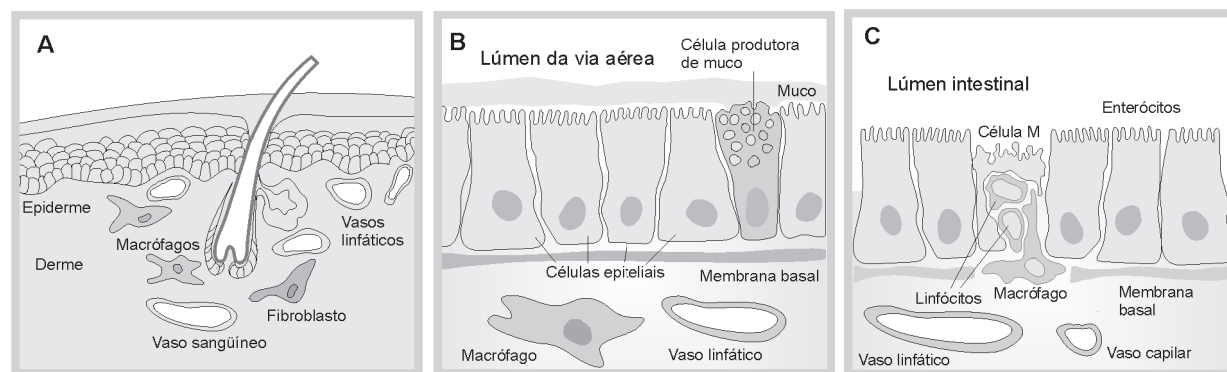
3.1.2 Trato respiratório

A mucosa do trato respiratório provavelmente se constitui na principal via de penetração de vírus, por causa de sua grande superfície e grande quantidade de patógenos potencialmente presentes no ar inspirado. Não obstante, o sistema respiratório apresenta barreiras que limitam ou reduzem as chances dos vírus que penetram

Tabela 8.3. Principais vírus que penetram pelo trato respiratório para iniciar a infecção do hospedeiro

	Família	Vírus
Produzem doença respiratória ou localizada	<i>Herpesviridae</i>	Herpesvírus de várias espécies.
	<i>Adenoviridae</i>	Adenovírus de várias espécies.
	<i>Paramyxoviridae</i>	Vírus da parainfluenza (PIVs) e vírus respiratórios sinciciais (RSVs).
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Vírus da influenza suína e eqüina.
	<i>Coronaviridae</i>	Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBDV).
	<i>Picornaviridae</i>	Vírus da febre aftosa (FMDV); rinovírus de várias espécies.
	<i>Caliciviridae</i>	Calicivírus felino (FCV).
Produzem doença sistêmica	<i>Herpesviridae</i>	Vírus da doença de Aujeszky (PRV), vírus da doença de Marek, vírus da febre catarral maligna (MCFV).
	<i>Paramyxoviridae</i>	Vírus da cinomose (CDV), vírus da peste bovina (rinderpest).
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Vírus da influenza aviária (AIV).
	<i>Flaviviridae</i>	Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)*; vírus da peste suína clássica (CSFV).

* O BVDV pode também causar doença respiratória.
Fonte: adaptada de Murphy et al. (1999).



Fonte: adaptada de Flint et al., (2000).

Figura 8.3. Estrutura do epitélio e tecidos subjacentes dos principais locais de penetração de vírus nos hospedeiros. A) Pele e tecido subcutâneo; B) Epitélio do trato respiratório; C) Epitélio do trato digestivo (intestino).

pelo ar inspirado conseguirem atingir e penetrar nas células epiteliais. As vias aéreas superiores e inferiores contêm um epitélio ciliado recoberto com muco, cuja função é reter e, eventualmente, expulsar as partículas inaladas. Além de reter as partículas víricas, o muco pode conter IgA específica, que pode neutralizar a infectividade dos vírus. Os alvéolos são desprovidos dessas defesas, porém possuem macrófagos residentes encarregados de fagocitar e digerir partículas exógenas. Além disso, a temperatura nas vias aéreas superiores é aproximadamente 3 a 5°C inferior à temperatura corporal, o que pode restringir a replicação de alguns vírus. Por isso, os vírus incapazes de replicar à temperatura corporal (rinovírus), replicam somente no trato respiratório superior. Já os vírus capazes de replicar sob temperatura corporal, podem causar infecção no trato respiratório inferior.

Os vírus geralmente penetram no trato respiratório através de aerossóis produzidos por expectorações (tosse e espirro) ou pelo contato nasal com fômites contaminados. O hábito investigativo olfatório de várias espécies animais se constitui em um fator de risco que favorece as infecções da mucosa nasal e do focinho. A maioria dos vírus que penetra por essa via realiza a replicação primária em células epiteliais das vias respiratórias; alguns podem replicar em macrófagos livres no lúmen respiratório ou em espaços subepiteliais. A replicação dos vírus que penetram pelas vias aéreas pode ficar restrita ao epitélio respiratório

ou se disseminar para outros tecidos e órgãos. Ou seja, os vírus que penetram pelo trato respiratório podem produzir infecções localizadas ou disseminadas (Tabela 8.3). Os tecidos subjacentes ao epitélio respiratório possuem vasos linfáticos e sanguíneos que facilitam a disseminação dos vírus até os órgãos linfóides secundários e daí para o sangue (Figura 8.3B).

3.1.3 Orofaringe e trato digestivo

A mucosa do trato digestivo, desde a orofaringe até os segmentos finais do intestino, pode se constituir em local de penetração para vários vírus, que produzem tanto infecções localizadas como sistêmicas. Os vírus adquiridos pela ingestão de alimentos ou água contaminada, ou pelo contato oral com fômites, podem ser deglutidos e alcançar o estômago e intestinos; ou podem infectar as células superficiais da orofaringe. Os vírus que replicam na orofaringe podem ser, posteriormente, deglutidos ou podem se disseminar sistemicamente pela via hematogênica. Os rotavírus, coronavírus, calicivírus e muitos enterovírus produzem infecções localizadas no intestino delgado; o parvovírus canino penetra na mucosa da orofaringe e, por via hematogênica, atinge o epitélio intestinal, onde replica e provoca distúrbios celulares que resultam em doença; o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pode penetrar na mucosa da orofaringe e se disseminar sistemicamente. Alguns vírus podem penetrar através

da mucosa intestinal e causar doença sistêmica, como alguns adenovírus de aves e de mamíferos e alguns enterovírus.

O trato digestivo apresenta várias barreiras que restringem ou dificultam a infecção por determinados vírus. O pH ácido do estômago, a alcalinidade do intestino delgado, as enzimas digestivas presentes na saliva e no suco pancreático, e as enzimas lipolíticas presentes na bile restringem o número de vírus que é capaz de infectar o hospedeiro por essa via.

Como regra, os vírus não-envelopados são mais resistentes ao pH ácido do estômago. Exceções incluem os rinovírus e o FMDV (picornavírus), que são lábeis à pH ácido e não resistem ao pH do estômago. Para estabelecer a infecção, portanto, esses vírus devem penetrar na mucosa orofaríngea ou nasal. Embora sejam sensíveis ao pH baixo e à ação da bile, os coronavírus de várias espécies animais resistem às condições do estômago e intestino e podem estabelecer infecções intestinais. Em geral, os vírus que causam infecções intestinais, como os rotavírus, calicivírus e enterovírus, são resistentes ao pH baixo e à ação da bile e, por isso, podem penetrar a partir do lúmen intestinal.

As enzimas proteolíticas presentes no lúmen intestinal podem também favorecer a infecção por alguns vírus, pela clivagem e ativação de proteínas da superfície dos vírions que são envolvidas na penetração do vírus na célula hospedeira. Como exemplos, citam-se: a tripsina, pancreatina e elastina que aumentam a infectividade dos rotavírus; e outras enzimas que ativam os processos de penetração dos reovírus e de alguns coronavírus. Enzimas presentes em secreções respiratórias também têm sido envolvidas na ativação de proteínas de fusão dos paramixovírus.

Os vírus associados com gastroenterite podem infectar uma variedade de células do trato gastrointestinal. Os adenovírus, rotavírus, calicivírus e coronavírus infectam predominantemente enterócitos maduros quiescentes. Outros vírus possuem tropismo por células das criptas que estão em divisão (parvovírus) ou por células epiteliais especializadas, como as células M (poliovírus e reovírus). As células M podem também capturar vírions no lúmen intestinal e transportá-

los para células mononucleares adjacentes, onde ocorrerá a replicação primária (Figura 8.3C).

Dentre os vírus animais que penetram pelo trato digestivo e estão associados com diarreia estão os parvovírus (canino e felino), os rotavírus de várias espécies, os coronavírus entéricos, os astrovírus e calicivírus. Outros vírus penetram pelo trato digestivo e estão associados com doença disseminada, geralmente sem diarreia, como os adenovírus de várias espécies, os enterovírus, o vírus do exantema vesicular de suínos, entre outros. Estes vírus utilizam o epitélio intestinal para a replicação primária e amplificação, de onde ganham acesso ao sistema linfático e sanguíneo (Figura 8.3C).

3.1.4 Mucosa urogenital

A mucosa do trato genital da fêmea pode servir de local de penetração tanto para vírus sistêmicos, que são excretados no sêmen, como para vírus que produzem infecções localizadas no trato genital masculino. No primeiro caso, a transmissão pode ser pela monta natural ou pela inseminação artificial, já que os vírus encontram condições ideais de sobrevivência em sêmen industrializado. Os herpesvírus de várias espécies animais podem ser transmitidos pelo sêmen e/ou pela cópula; o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) foi amplamente disseminado pela inseminação artificial; a monta natural é uma importante forma de transmissão do vírus da arterite viral equina (EAV). Os papilomavírus que causam lesões genitais também podem ser transmitidos pela cópula, por causa do contato entre as mucosas. Embora o BoHV-1 possa ser excretado pelo sêmen durante a infecção aguda respiratória, a transmissão venérea desse vírus está mais frequentemente associada com a infecção genital (balanopostite).

Os tecidos submucosos são altamente irrigados e fornecem condições propícias para a disseminação dos vírus pela linfa ou pelo sangue para os linfonodos regionais ou para tecidos mais distantes. As terminações nervosas, localizadas na submucosa, constituem-se em alvos para a pe-

netração pelos herpesvírus, que são, então, transportados até gânglios nervosos regionais.

Embora com menor frequência, fêmeas que desenvolvem infecções genitais também podem transmitir o vírus para o macho durante a cópula, o que favorece a disseminação do agente, pois o macho infectado pode transmitir o agente para outras fêmeas.

3.2 Infecções localizadas *versus* infecções disseminadas (ou sistêmicas)

Os padrões de distribuição e envolvimento de diferentes órgãos e tecidos variam amplamente com os vírus e estão intimamente associados com a biologia do agente, sendo dependentes de suas interações com o hospedeiro. Alguns vírus produzem infecções localizadas, geralmente limitadas às proximidades dos sítios de penetração e replicação primária. Esse padrão de infecção é característico dos vírus respiratórios (rinovírus, vírus da influenza e parainfluenza), gastrintestinais (coronavírus e rotavírus) e de alguns vírus que infectam a derme e epiderme (papilomavírus, alguns poxvírus, vírus da mamilite herpética [BoHV-2]). Essas infecções estão geralmente limitadas ao epitélio, mas a penetração e envolvimento de tecidos subjacentes e disseminação sistêmica podem ocasionalmente ocorrer. As infecções que se restringem aos sítios de replicação primária e suas proximidades são ditas *localizadas*.

Outros vírus são capazes de se disseminar a longas distâncias pelo sangue ou pela linfa e produzir infecções em órgãos específicos ou infecções generalizadas. Exemplos incluem o CDV, os parvovírus canino (CPV) e felino (FPLV), o BVDV, os retrovírus, entre outros. As infecções que se estendem além dos sítios de replicação primária são chamadas de *disseminadas*; e as que atingem vários órgãos ou sistemas são denominadas *sistêmicas* ou *generalizadas*.

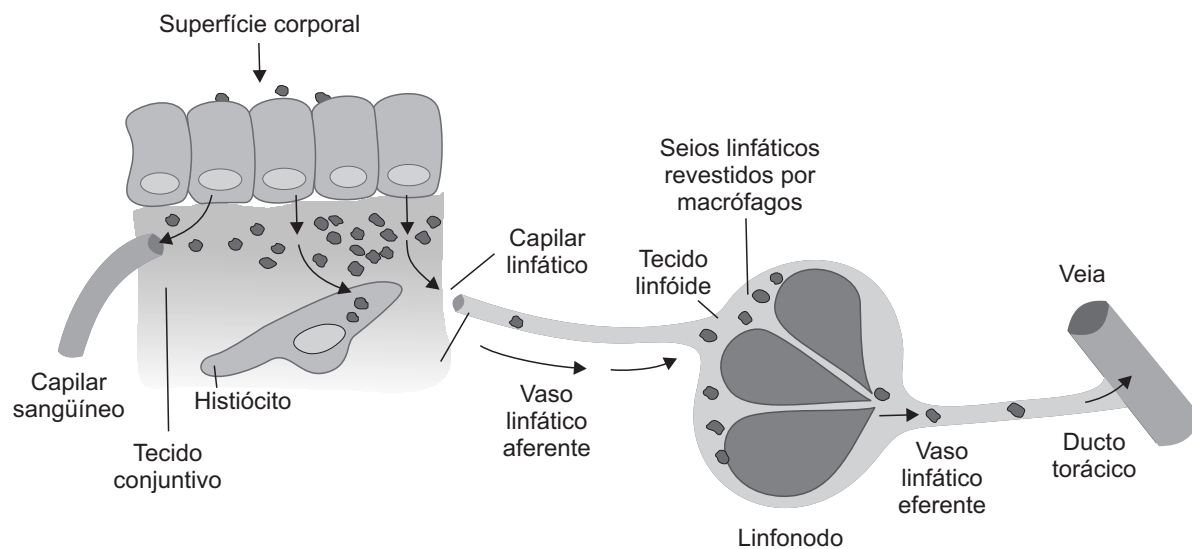
3.2.1 Disseminação local

Após a replicação primária, muitos vírus se disseminam localmente pela transmissão entre células vizinhas. Essa forma de transmissão, no

entanto, não permite uma disseminação a longas distâncias e essas infecções são geralmente controladas pela resposta imune do hospedeiro. Os vírus que penetram na mucosa respiratória ou digestiva e que são liberados pela superfície apical de células epiteliais podem ser transportados por fluidos ou pelo muco e se disseminar rapidamente pelo lúmen do órgão. A replicação de muitos desses vírus fica restrita ao epitélio, com nenhuma ou pouca invasão dos tecidos subjacentes. Paralelamente, os vírions podem ser transportados até os linfonodos regionais, livres na linfa ou no interior de células fagocíticas. Esta é geralmente a primeira etapa na disseminação das infecções sistêmicas. Em geral, os vírus que são liberados apenas na superfície apical das células epiteliais tendem a ficar restritos localmente, enquanto aqueles que são liberados também pela superfície basolateral são mais prováveis de produzirem infecções sistêmicas.

3.2.2 Disseminação hematógena

O transporte pelo sangue oferece aos vírus a oportunidade de atingir virtualmente todos os órgãos e tecidos em poucos minutos a partir dos sítios de replicação primária. Os vírions podem penetrar no sangue diretamente através da parede capilar, após a infecção de células endoteliais ou pela inoculação direta por insetos ou por instrumentos contaminados. A disseminação hematógena se inicia quando os vírions produzidos nos sítios primários de replicação são liberados no líquido extracelular e drenados pelo sistema linfático, cujos capilares são mais permeáveis do que os capilares sangüíneos. Os vírions veiculados pela linfa eventualmente ganham acesso à corrente sangüínea, seja como partículas livres no plasma, seja no interior de linfócitos ou monócitos/macrófagos infectados durante a sua passagem pelos linfonodos regionais. De fato, a patogenia de várias infecções víricas está intimamente associada com a infecção de células do sistema imunológico, que ocorre devido ao seu contato com os vírions nos órgãos linfóides periféricos. Uma vez no sangue, os vírions se disseminam rapidamente pelo organismo. O trajeto



Fonte: adaptada de Mims e White (1984).

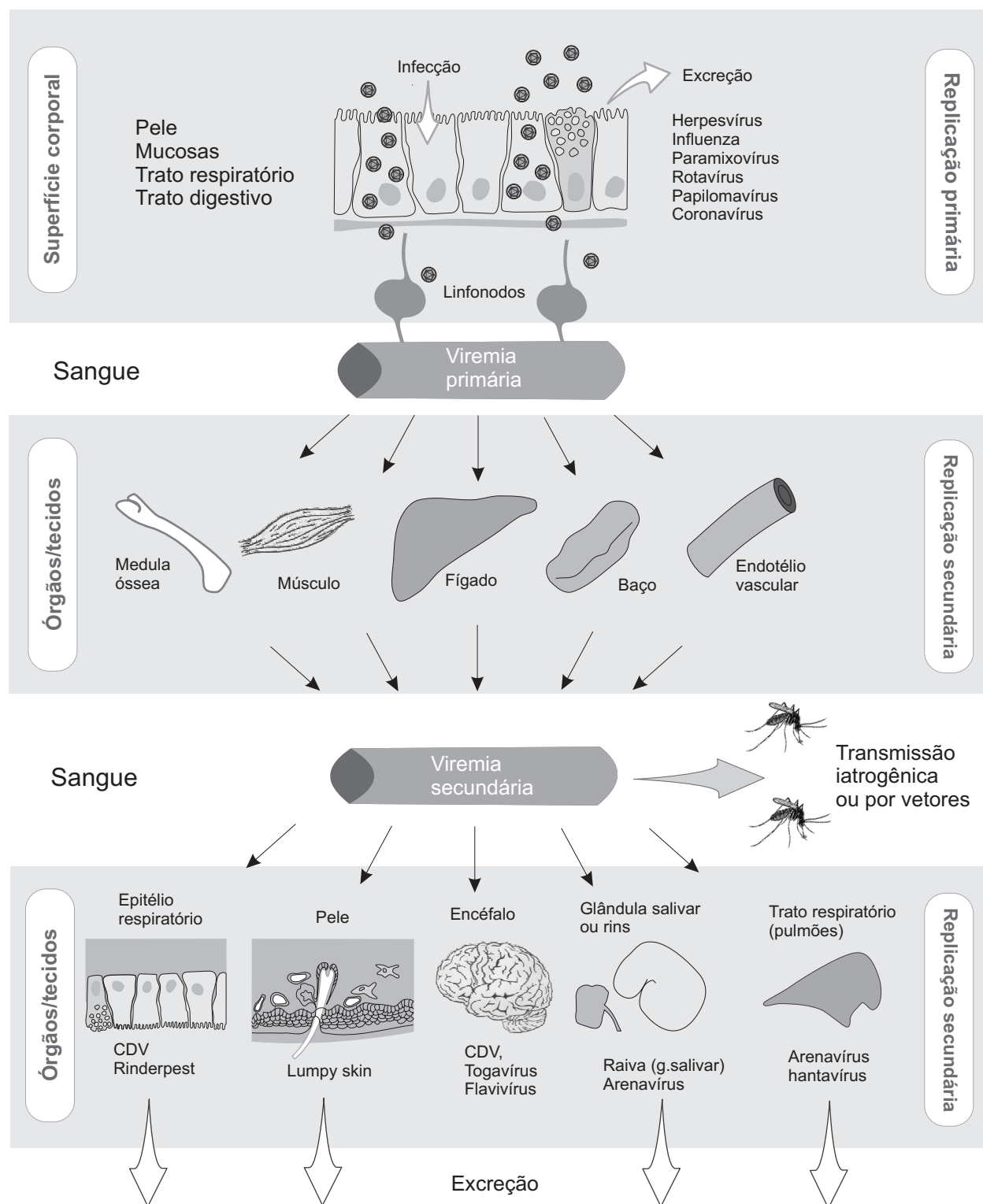
Figura 8.4. Trajeto dos vírus que penetram pela pele ou mucosas superficiais para atingir o sangue e se distribuir sistemicamente.

utilizado pelos vírus que penetram no organismo através de superfícies cutâneas ou mucosas para atingir a corrente sanguínea está ilustrado na Figura 8.4.

A presença de vírus no sangue é denominada *viremia* e, dependendo da origem do vírus, pode ser classificada em passiva ou ativa. A *viremia passiva* resulta da introdução do vírus diretamente no sangue, sem a prévia replicação em tecidos. Esta introdução pode resultar de inoculação direta por insetos hematófagos, por transfusão sanguínea ou por outras formas de inoculação de sangue. Essas viremias são geralmente transitórias e não duram mais de 12-24 h, mas podem ser de tal magnitude a ponto de provocar a infecção maciça de alguns órgãos. As *viremias ativas* resultam da replicação viral em tecidos e órgãos do hospedeiro e geralmente atingem uma maior magnitude e duração. Os vírus presentes no sangue podem ter várias origens, tais como: a) partículas víricas presentes nos tecidos próximos aos locais de penetração podem ser capturadas pelo sistema linfático e ter acesso ao sangue; b) vários vírus replicam em células localizadas nos linfonodos, podendo ser liberados e ter acesso ao sangue; c) alguns vírus são capazes de replicar

em células endoteliais e são liberados diretamente na circulação; d) vários vírus replicam em células mononucleares do sistema linforreticular (monócitos/macrófagos; linfócitos) e podem ser liberados no sangue.

Em várias infecções víricas, duas etapas de viremia ativa podem ser detectadas. A *viremia primária* resulta da replicação viral nos sítios iniciais, geralmente atinge baixa magnitude, mas permite a disseminação do vírus aos órgãos secundários de replicação, denominados órgãos-alvo. A replicação viral nesses tecidos produz uma *viremia secundária*, caracterizada por uma presença maciça de vírus no sangue e disseminação ainda maior da infecção. Os resultados da viremia são variáveis e, freqüentemente, resultam em infecção de vários tecidos periféricos, com resultados que dependem do tropismo, da patogenicidade e virulência do vírus. Uma consequência freqüente de viremia em animais é a transmissão transplacentária do vírus ao feto, podendo resultar em uma variedade de condições que vão desde uma infecção transitória até a morte fetal, seguida de abortamento. As etapas da patogenia das infecções víricas localizadas e disseminadas estão ilustradas na Figura 8.5.



Fonte: adaptada de Mims e White (1984).

Figura 8.5. Etapas da patogenia das infecções víricas localizadas e sistêmicas: papel da viremia na disseminação das infecções.

No sangue, os vírions podem ser transportados livres no plasma, no interior de leucócitos ou aderidos à membrana de leucócitos, eritrócitos ou plaquetas. Os flavivírus, togavírus, enterovírus e parvovírus circulam livres no plasma e produzem a chamada viremia plasmática. A concentração de partículas víricas no sangue depende de um equilíbrio entre a sua produção nos tecidos infectados e a taxa de remoção ou inativação no sangue. A tarefa de remover vírions circulantes cabe às células fagocíticas do sistema retículo-endotelial, principalmente às células de Küpfer no fígado e, em menor proporção, aos macrófagos dos pulmões, baço e linfonodos.

Os vírus que circulam livres no plasma podem entrar em contato e infectar uma grande variedade de células, mas dois tipos celulares desempenham um papel importante para a continuidade da infecção: as células endoteliais e os macrófagos adjacentes aos vasos. As interações entre os vírions circulantes e as células de Küpfer no fígado podem resultar em: a) internalização e inativação dos vírions; b) internalização, transporte transcitoplasmático e liberação dos vírions na bile; c) infecção dessas células e liberação da progênie viral de volta ao sangue, incrementando a viremia; d) infecção celular e liberação dos vírions recém-produzidos pela superfície basal, resultando na infecção maciça de hepatócitos. A infecção das células endoteliais pode favorecer a invasão viral nos tecidos a partir do sangue.

Em etapas mais avançadas da infecção, os anticorpos produzidos são capazes de se ligar e neutralizar as partículas víricas livres no plasma sanguíneo. A ligação dos anticorpos aos vírions também facilita a fagocitose dos complexos antígeno-vírions por macrófagos adjacentes aos vasos sanguíneos teciduais. Esses macrófagos se ligam aos complexos imunes por meio de receptores para a porção Fc das imunoglobulinas. A maioria das viremias plasmáticas possui duração limitada e o seu término coincide com o aparecimento de anticorpos neutralizantes no soro.

Vários vírus replicam em células sanguíneas, particularmente monócitos e linfócitos B e T, e a sua presença no sangue está predominantemente associada com essas células. As viremias associadas a células apresentam algumas características

que as distinguem das viremias plasmáticas, tais como: a) no interior das células os vírus estão protegidos dos anticorpos neutralizantes e podem se propagar a grandes distâncias; b) os títulos virais são geralmente baixos; c) o isolamento do vírus do sangue é geralmente difícil e pode requerer o co-cultivo de leucócitos com células de cultivo. Essa dificuldade de isolamento pode ser devida aos baixos níveis de replicação do vírus e/ou à presença de anticorpos neutralizantes; d) em algumas infecções, a viremia persiste por toda a vida do animal e não termina com o aparecimento dos anticorpos neutralizantes. Exemplos desse tipo de viremia são encontrados nas infecções por retrovírus animais, como o FIV, o vírus mae-di-visna (MVV), o vírus da leucose bovina (BLV) e o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV). Em algumas dessas infecções, a contínua evolução genética da população viral produz variantes que escapam da neutralização por anticorpos e que podem ser isolados do plasma. Esses vírus, no entanto, parecem representar uma pequena parcela do total de vírus que é produzido e que é neutralizado e capturado nos complexos imunes. O vírus da língua azul (BTV) produz viremia persistente e os vírions encontram-se aderidos à membrana dos eritrócitos. Embora mais estudada em infecções persistentes, a viremia associada a células também é observada em infecções agudas, como a infecção de cães pelo CDV, entre outras. O BVDV pode ser encontrado em linfócitos e monócitos, mas viremia plasmática também pode ser detectada em animais persistentemente infectados. Esses animais são imunotolerantes a antígenos virais e, por isso, não produzem anticorpos contra o vírus. Com isso, o vírus infeccioso pode ser continuamente isolado do plasma desses animais.

3.2.1.1 Penetração dos vírus nos tecidos

Os vírus que se disseminam pela via hematogênica devem ultrapassar a parede vascular para invadir e replicar nos tecidos e órgãos-alvo. Embora seja uma etapa fundamental na patogenia das infecções por virtualmente todos os vírus patogênicos que produzem viremia, poucos detalhes são conhecidos sobre a penetração dos vírus

nos tecidos. O mecanismo de penetração utilizado pelos vírus depende da sua biologia e também da estrutura e relações do endotélio vascular, que varia muito entre os diferentes tecidos. Os possíveis mecanismos utilizados, já demonstrados para alguns vírus, estão ilustrados na Figura 8.6 e descritos a seguir:

1) Penetração passiva pelo espaço entre as células endoteliais. Esse mecanismo é possível em alguns endotélios que apresentam fenestras entre as células endoteliais, como o plexo coróide no SNC. Após atravessar esta barreira, os vírus podem infectar as células epiteliais do plexo coróide e ganhar acesso ao fluido cérebro-espinhal e, assim, disseminar-se pelos espaços ocupados por esse fluido. Exemplos de vírus que provavelmente utilizam essa via de invasão incluem o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) e o retrovírus (MVV). Os vasos dos túbulos renais, pâncreas, cólon e íleo também apresentam fenestras que podem servir para a penetração dos vírus nos tecidos a partir do sangue;

2) Os vírions podem ser transportados através do endotélio vascular por endocitose, seguida de transporte vesicular intracitoplasmático e exocitose na face oposta da célula endotelial. Para que essas duas formas de invasão possam ocorrer, a concentração de vírions no sangue deve ser alta e contínua, e o fluxo sanguíneo no local deve ser lento, para permitir o contato e aderência das partículas víricas ao endotélio e/ou penetração pelos espaços interendoteliais;

3) Alguns vírus podem infectar as células endoteliais e/ou células adjacentes e completar o seu ciclo replicativo nessas células. Assim, a sua progênie pode ser liberada através da superfície basal ou basolateral dessas células e infectar células teciduais subjacentes. Essa forma de invasão tecidual já foi demonstrada para os picornavírus, retrovírus, alfavírus e parvovírus. As células de Küpfer, que estão localizadas entre as células endoteliais dos sinusóides hepáticos, servem de porta de entrada para vírus que são veiculados no sangue. Os vírus podem ser transportados passivamente ou replicarem ativamente nessas células;

4) Os vírus que produzem viremia associada a células, em monócitos ou linfócitos, podem ser transportados através da parede vascular no in-

terior das células infectadas. As células mononucleares do sangue estão frequentemente atravessando a parede vascular e penetrando nos tecidos em resposta a estímulos inflamatórios e podem funcionar como verdadeiros “cavalos de Tróia”, transportando os vírus para os tecidos. O movimento de células através do endotélio em direção aos tecidos é denominado *diapedese*. Essa forma de invasão tem sido demonstrada para o CDV, vírus da febre amarela (YFV) e também para explicar a penetração do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) no encéfalo.

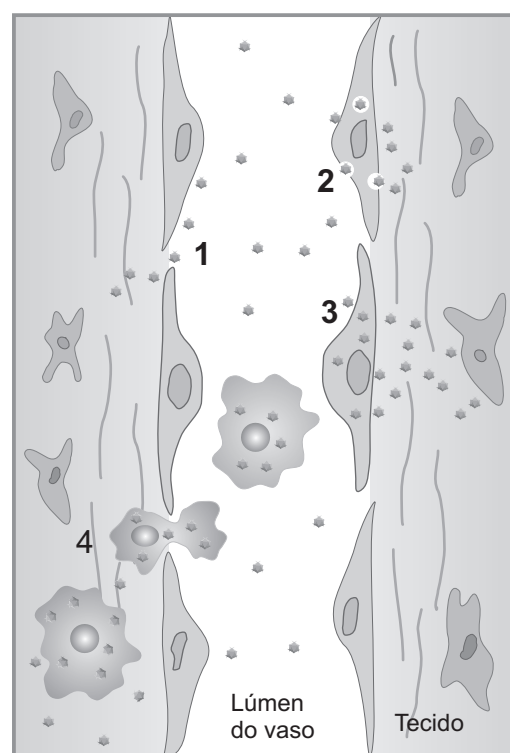


Figura 8.6. Mecanismos de penetração de vírus nos tecidos a partir do sangue. 1) Penetração pelos espaços existentes entre as células endoteliais; 2) Transporte ativo através das células endoteliais; 3) Infecção das células endoteliais com posterior egresso da progênie viral na face oposta do endotélio; 4) Transporte através do endotélio no interior de monócitos/linfócitos.

3.2.1.2 Infecção celular mediada por anticorpos (*antibody-dependent enhancement of viral infection, ADE*)

A ADE é um mecanismo utilizado por alguns vírus para penetrar produtivamente e replicar em células que expressam receptores para a

porção Fc das imunoglobulinas, principalmente os monócitos e macrófagos. Nessas células, os receptores de Fc são importantes para a captura e inativação de complexos imunes formados nos fluidos e tecidos corporais. O fenômeno de ADE ocorre quando os vírions são recobertos por anticorpos sem atividade neutralizante ou quando os níveis de anticorpos específicos são baixos. Assim, a ligação dos anticorpos não neutraliza a infectividade dos vírions. No entanto, as células que expressam receptores para a região Fc se ligam aos complexos anticorpos-vírions através da região Fc. Essa ligação é seguida pela internalização dos complexos nas células, após a qual os vírions podem ser liberados no citoplasma e iniciar a replicação. Ou seja, além de não neutralizar a infectividade dos vírions, os anticorpos auxiliam a sua penetração nas células que possuem receptores de Fc. Esse mecanismo somente ocorre para vírus que infectam naturalmente células que expressam esses receptores. Embora a ADE já tenha sido demonstrada para vários vírus *in vitro*, o seu papel na patogenia das infecções víricas *in vivo* ainda é controverso e parece se restringir a poucos vírus, como o vírus da dengue em humanos e o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV, um coronavírus). Nesses casos, a presença de anticorpos em níveis baixos contra um determinado sorotipo do vírus resulta em um aumento da severidade da doença por ocasião de uma reinfecção com um sorotipo heterólogo. De fato, tem sido demonstrado que a peritonite infecciosa dos gatos é mais severa em animais previamente vacinados, reforçando a possibilidade de que a ADE contribua na patogenia da doença.

3.2.3 Disseminação nervosa

Vários vírus se disseminam a partir dos sítios de replicação primária no interior de fibras nervosas cujas terminações se distribuem nesses locais. Essa forma de transporte é utilizada por vírus essencialmente neuropatogênicos (vírus da raiva e vários alfa herpesvírus) e também por vírus cuja invasão do sistema nervoso representa uma circunstância da sua replicação e disseminação hematogênica (reovírus e poliovírus). Alguns vírus, como o CDV e o vírus da artrite e encefali-

te caprina (CAEV), replicam no SNC e produzem doença neurológica, porém parecem atingir o encéfalo pela via hematogênica. Dentre os vírus animais que utilizam a via nervosa para invadir o encéfalo e causar doença neurológica se incluem o BoHV-5, o PRV, o EHV, o vírus da raiva, o vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV) e o vírus da doença de Borna (BDV). Em modelos animais, o VEEV parece também utilizar a via hematogênica para invadir o encéfalo e produzir encefalite. Embora os vírus que se disseminam pela via nervosa e replicam no sistema nervoso sejam denominados classicamente vírus neurotrópicos, esses agentes são capazes de infectar uma variedade de células. De fato, a replicação inicial desses vírus ocorre geralmente no epitélio e em tecidos adjacentes aos locais de penetração, após a qual os vírions penetram nas terminações nervosas.

O mecanismo de penetração dos vírus em neurônios parece ser similar ao utilizado para iniciar a infecção de outras células. Após a penetração e desnudamento, o nucleocapsídeo é transportado passivamente ao longo dos processos neuronais (dendritos e axônios) por transporte axoplásmico rápido. O vírus pode ocasionalmente replicar nos axônios ou dendritos, mas este é um processo lento e não é requerido para a disseminação. Drogas que inibem o transporte axonal (p. ex.: colchicina) também bloqueiam a progressão dos vírus ao longo dos axônios.

Essa forma de disseminação tem sido estudada com detalhes nos alfa herpesvírus, em que o transporte neural até os gânglios sensoriais e autonômicos é essencial para o estabelecimento de infecção latente, que, por sua vez, é crítica para a manutenção desses vírus na natureza (Figura 8.7). Após a replicação na mucosa nasal ou genital, os vírions penetram em terminações dos nervos que se distribuem nas camadas subjacentes. Os vírions íntegros ou partículas subvirais são transportados em vesículas ao longo dos microtúbulos dos axônios ou dendritos até os corpos neuronais que se localizam nos gânglios nervosos regionais (gânglio trigêmeo, no caso de infecção oronasal; gânglios sacrais, no caso de infecção genital). O transporte axonal de substâncias das terminações nervosas em direção ao corpo neuronal é deno-

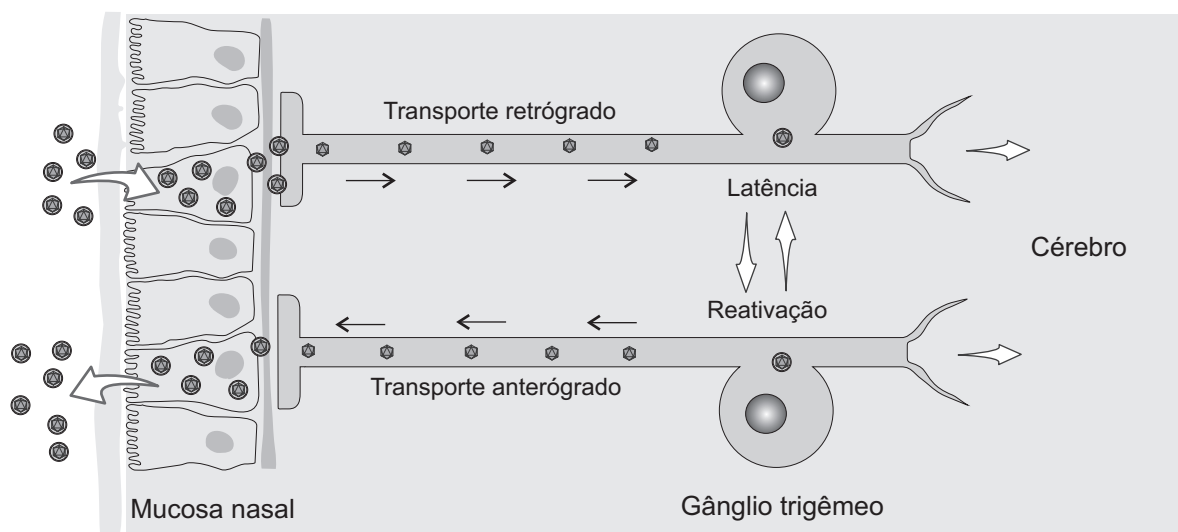


Figura 8.7. Disseminação neural dos alfa herpesvírus animais do epitélio respiratório para os gânglios sensoriais durante a infecção aguda (transporte retrógrado) e do corpo dos neurônios para o epitélio nasal durante a reativação da infecção latente (transporte anterógrado). Durante a infecção aguda (e menos frequentemente durante a reativação), pode ocorrer transporte anterógrado em direção ao SNC, com invasão e replicação viral no encéfalo.

minado *retrógrado*. Ao alcançar os corpos neuronais, os alfa herpesvírus replicam ativamente de forma lítica ou estabelecem infecção latente. A infecção latente é caracterizada pela presença do genoma viral inativo no núcleo dos neurônios, sem expressão gênica ou produção de progênie viral. Em determinadas circunstâncias, geralmente associadas com estresse, ocorre a reativação da infecção, a retomada da expressão gênica e a produção de partículas víricas infecciosas. Essas partículas são transportadas de volta aos locais de replicação primária pelas mesmas vias nervosas que haviam servido de acesso para os vírions aos corpos neuronais. O transporte de vesículas e substâncias do corpo neuronal em direção às terminações nervosas denomina-se *anterógrado* e permite a progênie viral alcançar os tecidos periféricos, replicar e ser excretada.

Em alguns vírus (BoHV-5 e PRV), a replicação nos corpos neuronais durante a infecção aguda (e provavelmente também durante a reativação da infecção latente) também pode ser seguida pelo transporte *anterógrado* da progênie viral ao longo das fibras nervosas em direção ao encéfalo. Esses vírus são capazes de se transmitir através de sinapses nervosas e se disseminar ao longo de circuitos neuronais sinapticamente

ligados, resultando em invasão e replicação no encéfalo. As infecções neurológicas acompanhadas de meningoencefalite severa são frequentes em bovinos infectados pelo BoHV-5 e em suínos jovens infectados pelo PRV. Alguns alfa herpesvírus que causam meningoencefalite (BoHV-5, por exemplo), parecem invadir o encéfalo principalmente pela via olfatória que, provavelmente, se constitui em uma via mais eficiente e rápida de transporte do que a via trigeminal. Outros (PRV e BoHV-1) parecem atingir o sistema nervoso, principalmente pelos ramos sensoriais do nervo trigêmeo. O transporte neural permite a propagação do vírus aos órgãos-alvo sem exposição ao sistema imunológico.

Embora as vias hematogênica e neural sejam frequentemente consideradas como vias excludentes (alternativas) de disseminação viral, a patogenia de alguns vírus parece envolver a participação de ambas. A invasão dos vírus das encefalites equinas do leste (EEEV), oeste (WEEV) e venezuelana (VEEV) no encéfalo de animais infectados experimentalmente, por exemplo, já foi demonstrado que pode ocorrer por ambas as vias, embora uma delas provavelmente desempenhe um papel preponderante em infecções naturais.

3.3 Localização das infecções

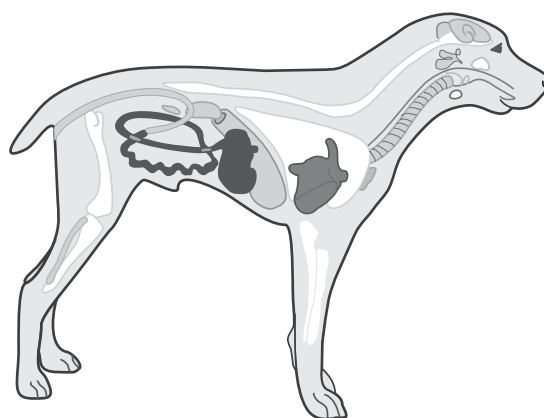
3.3.1 Infecções em órgãos e sistemas específicos

O padrão de doença sistêmica produzida durante uma infecção depende dos órgãos e tecidos-alvo do vírus, das populações de células desses órgãos que são infectadas e também do tipo de alterações produzidas pela replicação viral nessas células. Felizmente, nenhum vírus é capaz de infectar todos os tecidos e células do hospedeiro. Na verdade, devido a sua dependência de processos bioquímicos e moleculares específicos, a maioria dos vírus infecta um número limitado de tipos celulares no hospedeiro. As Figuras 8.8 a 8.12 apresentam alguns padrões peculiares de disseminação, distribuição e localização de infecções víricas em cães.

O termo *tropismo* é utilizado para designar a predileção dos vírus por determinadas células, tecidos ou órgãos. Assim, o tropismo é um dos principais determinantes da patogenia das infecções víricas. O tropismo celular ou tecidual de um vírus é determinado pela interação entre múltiplos fatores virais e celulares, e pode ser influenciado em diferentes níveis. A constituição e fisiologia da membrana plasmática (presença de receptores, co-receptores, atividade endocítica, espessura do citoesqueleto cortical etc.) podem afetar as etapas iniciais da infecção (adsorção, penetração, desnudamento e transporte intracelular dos vírions). A presença de fatores de transcrição, de transativadores ou inibidores e de enzimas polimerases pode afetar a expressão dos genes virais. Proteases e nucleases celulares podem ativar ou inativar fatores virais. Os mecanismos celulares de transporte e distribuição de macromoléculas podem afetar a replicação, distribuição, morfogênese e liberação da progênie viral, ou seja, o tropismo de um vírus pode ser determinado por fatores que atuam em qualquer etapa do ciclo replicativo, desde o seu início até a etapa de egresso das partículas víricas.

A presença de receptores específicos na membrana da célula hospedeira é o principal fator determinante do tropismo para a maioria dos vírus. Em geral, os receptores virais são restritos

a determinados tipos celulares ou tecidos, e apenas estes podem ser infectados naturalmente. Por isso, a distribuição de receptores nos tecidos e órgãos é um determinante importante da patogenia dos vírus. Existem vários exemplos de mutações naturais ou induzidas nas proteínas virais de ligação nos receptores que resultam em alteração no tropismo e/ou na virulência do vírus mutante. Esses exemplos ilustram a importância das interações vírion-receptores como determinantes do tropismo e da patogenia das infecções víricas.

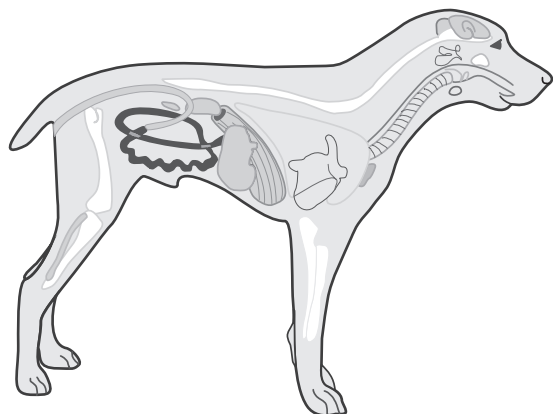


Fonte: www.bakerinstitute.vet.cornell.edu.

Figura 8.8. Patogenia da parvovirose canina. O CPV penetra pela via oronasal e replica inicialmente na orofaringe e nas tonsilas. Após a replicação primária, o vírus atinge a corrente sanguínea e é transportado sistemicamente pelo sangue. Os sítios de predileção para a replicação secundária são as células das criptas do intestino delgado, que expressam o receptor para o vírus e estão em multiplicação ativa. A replicação viral é acompanhada de destruição dessas células e reposição deficiente das células absortivas das vilosidades intestinais. Os cães com gastroenterite pelo CPV apresentam dificuldade de absorção de nutrientes, diarreia hemorrágica e desidratação. A infecção pelo CPV em filhotes caninos com menos de seis semanas de idade pode ser caracterizada por miocardite, pois nessa fase as células do miocárdio estão em constante mitose.

Embora aparentemente seja o principal determinante do tropismo, a presença dos receptores não é o único fator que determina a capacidade do vírus infectar um determinado tipo celular. Para alguns vírus DNA e retrovírus, a transcrição dos genes virais pode ser influenciada pela presença de fatores de transcrição e/ou inibidores celulares. A penetração em células que não

apresentem tais fatores pode resultar em infecção abortiva, pois os genes virais não são expressos ou são expressos em quantidades insuficientes

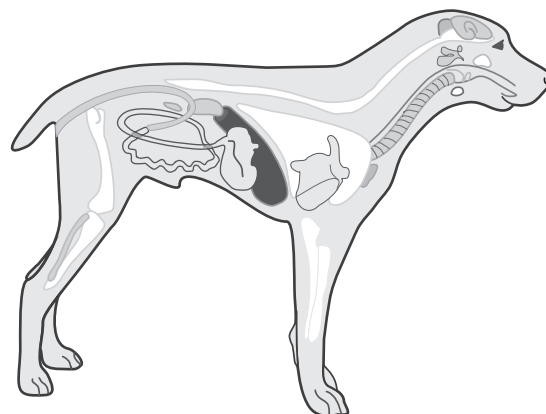


Fonte: www.bakerinstitute.vet.cornell.edu.

Figura 8.9. Patogenia da coronavirose canina. O coronavírus canino (CCoV) penetra pela via oral pela ingestão de água ou alimentos contaminados. O vírus atinge o intestino pela passagem direta pelo trato digestivo, pois resiste ao pH ácido do estômago. No intestino, o vírus infecta inicialmente as células das vilosidades do duodeno e posteriormente se dissemina até o íleo. A replicação nas células absortivas das vilosidades provoca uma enterite, que resulta em redução da absorção de nutrientes, diarreia e desidratação. O vírus é excretado nas fezes um a dois dias após a infecção. O CCoV pode, ainda, disseminar-se aos linfonodos mesentéricos e, ocasionalmente, replicar no baço e fígado.

Os parvovírus dependem da atividade da DNA polimerase celular e fatores associados para a replicação do seu genoma; por isso esses vírus apresentam tropismo marcante por células em divisão. Os papilomavírus dependem de células cuja síntese e transporte de nucleotídeos para o núcleo estejam ativos, além da atividade da DNA polimerase celular. O transporte de nucleocapsídeos até as proximidades dos poros nucleares é uma atividade requerida para a replicação dos adenovírus. A integração do provírus DNA de alguns retrovírus somente ocorre em células em atividade mitótica. A replicação dos papilomavírus está estritamente associada com o estágio de diferenciação dos queratinócitos e dos fatores celulares expressos por essas células. A capacidade infectiva dos coronavírus e paramixovírus é influenciada pela clivagem e maturação da proteína envolvida na fusão e penetração dos

víriões, que ocorre com eficiência diferente conforme o tipo celular. Assim, o tropismo desses vírus é parcialmente determinado pela capacidade de determinadas células de clivar a proteína viral de fusão. Esses exemplos ilustram a variedade de fatores celulares que podem ser determinantes do tropismo dos vírus por determinados tipos celulares.

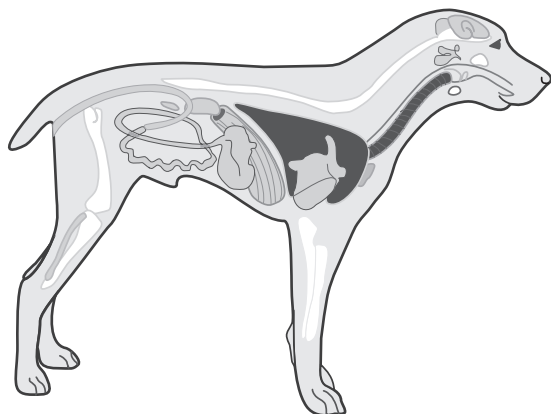


Fonte: www.bakerinstitute.vet.cornell.edu.

Figura 8.10. Patogenia da hepatite infecciosa canina. A infecção pelo adenovírus canino tipo 1 (CAAdV-1) pode ocorrer pela via oral, nasofaríngea e/ou conjuntiva, seguida de replicação primária nas tonsilas e placas de Peyer. Durante a viremia primária, o vírus se dissemina no organismo e infecta as células endoteliais dos vasos e as células parenquimais de vários tecidos. A replicação no parênquima hepático resulta em hepatite, com a ocorrência de hemorragia e necrose no órgão. Também são encontradas lesões na córnea e glomerulonefrite, resultantes da deposição de imunocomplexos. O epitélio tubular renal é um sítio de acesso limitado do sistema imune, permitindo a persistência do CAAdV-1 nesse local por vários meses.

A distribuição dos vírus nos tecidos e órgãos do organismo depende de um balanço entre o padrão de disseminação e o seu tropismo celular e tecidual. Os vírus que se disseminam pela via hematogênica podem ter acesso a virtualmente todos os tecidos do organismo. No entanto, a maioria desses vírus infecta apenas alguns tecidos ou órgãos ou podem ainda infectar apenas algumas células específicas nesses órgãos. Em resumo, a disseminação hematogênica permite ao vírus atingir virtualmente todos os tecidos, mas não assegura que a replicação irá ocorrer em todos os tecidos potencialmente atingidos. Por outro lado, a disseminação neural é predominantemente dire-

cional, pois o vírus se dissemina ao longo de circuitos neuronais sinápticamente ligados e infecta as populações de neurônios que recebem fibras dos neurônios previamente infectados. Durante a transmissão transsináptica, alguns vírions podem se disseminar localmente e infectar células vizinhas, mas esta infecção fica geralmente limitada. O egresso de vírions dos corpos neuronais no SNC, por outro lado, pode resultar em disseminação local e infecção de outros neurônios e também de células da glia.

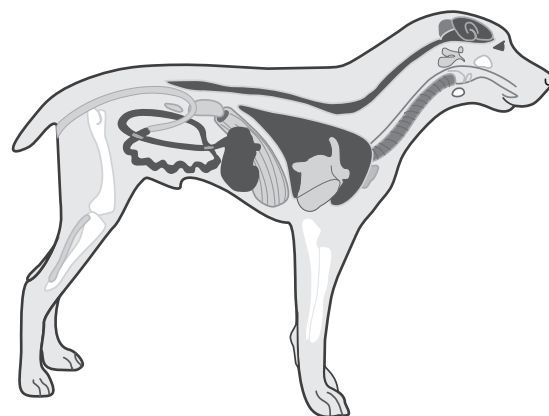


Fonte: www.bakerinstitute.vet.cornell.edu.

Figura 8.11. Patogenia da traqueobronquite infecciosa canina. Essa enfermidade pode ser causada por vários agentes virais e bacterianos, incluindo o vírus da parainfluenza canina (CPIV-2) e o adenovírus canino tipo 2 (CAV-2). Os agentes penetram pela via respiratória e replicam inicialmente no epitélio da nasofaringe. Posteriormente a infecção se dissemina para o epitélio pseudo-estratificado ciliado da traquéia. A injúria epitelial pela replicação viral e o processo inflamatório resultam em perda da função ciliar, aumento da produção de muco, com a ocorrência de tosse seca, engasgos e aumento da secreção nasal. A progressão da infecção para o trato respiratório inferior depende da infecção concomitante com bactérias e o quadro clínico-patológico pode evoluir para pneumonia, com tosse produtiva e febre. As infecções pelo CPIV-2 e pelo CAV-2 são geralmente restritas ao sistema respiratório, não causando viremia ou disseminação sistêmica.

A localização específica das infecções, isto é, a distribuição do vírus em órgãos, tecidos e em grupos de células específicas é determinada por vários fatores, que incluem a via de penetração e replicação primária, a via de disseminação, o tropismo tecidual e celular do vírus. Além desses fatores, as interações do vírus com os mecanismos imunológicos do hospedeiro também influen-

ciam a sua disseminação e localização no organismo. Cada vírus, em particular, produz um ou mais padrões característicos de disseminação e localização de suas infecções. É importante ressaltar que cepas ou isolados de um mesmo vírus podem apresentar padrões diferentes de disseminação e distribuição, podendo resultar em manifestações clínico-patológicas distintas. A seguir serão abordadas sucintamente as características das infecções nos principais órgãos ou sistemas do organismo. Detalhes da patogenia de cada infecção vírica serão abordados nos capítulos específicos.



Fonte: www.bakerinstitute.vet.cornell.edu.

Figura 8.12. Patogenia da cinomose canina. O CDV penetra geralmente pela via oronasal e replica inicialmente nos epitélios e em macrófagos das vias aéreas superiores, faringe e tonsilas. A replicação primária é seguida de viremia que permite a disseminação sistêmica do vírus e infecção de uma variedade de linfonodos e acúmulos linfóides, levando a um quadro de imunossupressão. Em cães que não conseguem montar uma resposta imune eficiente, o vírus produz uma viremia secundária, dissemina-se e replica em uma variedade de tecidos, incluindo células epiteliais da pele, dos tratos digestivo, respiratório e urinário, no sistema nervoso central e no sistema retículo-endotelial. Esses animais podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas, que possuem correlação com os órgãos/ tecidos afetados. A incapacidade de erradicar o vírus pode resultar em persistência viral no SNC.

3.3.2 Infecções da pele e tegumento

As células da epiderme e derme se constituem em alvos de replicação de vários vírus. Esses tecidos podem se constituir nos sítios de replicação primária após transmissão por contato,

abrasões, vetores mecânicos (alguns poxvírus e herpesvírus, papilomavírus) ou se constituir em sítios de replicação secundária após uma disseminação hematógena (alguns poxvírus, CDV). Por outro lado, os vírus que replicam na pele ou na transição muco-cutânea oronasal e genital podem produzir infecções localizadas (papilomavírus) ou se disseminar para outros órgãos a distância pela via sangüínea (vários poxvírus e alguns herpesvírus) ou neural (vários herpesvírus). O tecido dérmico e subdérmico são ricos em células e capilares sangüíneos e linfáticos, a partir dos quais os vírus podem se disseminar pelo organismo (ver Figuras 8.3A e 8.4).

Os efeitos da replicação viral nesses locais são mais pronunciados e visíveis em áreas desprovidas de pêlos, como as extremidades das orelhas, a transição muco-cutânea do focinho, da vulva, úbere e tetas, prepúcio e escroto. As infecções por contato freqüentemente resultam em lesões delimitadas, com o desenvolvimento de eritema e edema localizados, máculas, pápulas, formação e ruptura de vesículas, pústulas e erosões. As erosões e a contínua exsudação podem levar ao acúmulo de fibrina, formando membranas finas que recobrem as lesões e, posteriormente, dessecam e formam crostas. A contaminação bacteriana das vesículas pode levar à formação de pústulas. Na infecção por alguns vírus (p. ex.: vírus do ectima contagioso dos ovinos), as crostas que se desprendem das lesões contêm o vírus e podem mantê-lo viável durante meses no meio ambiente, servindo de fonte de infecção para outros animais.

Algumas infecções sistêmicas podem resultar na formação de eritema, petéquias e sufusões na pele e/ou mucosas, sem estarem necessariamente associadas com a replicação viral nesses locais. Nesses casos, essas patologias estão associadas com alterações/lesões no endotélio vasculares e/ou com deficiências sistêmicas na coagulação sangüínea (p. ex.: trombocitopenia).

Embora vários vírus produzam infecções cutâneas e, assim, estão presentes nas lesões, nem todos utilizam esta via de excreção para serem transmitidos. Exceções são os herpesvírus, alguns poxvírus e os papilomavírus, que podem ser transmitidos de forma mecânica por vetores

ou por contato a partir das lesões superficiais (ver Figura 8.5).

3.3.3 Infecções do trato respiratório

Estima-se que aproximadamente 90% das infecções respiratórias de animais possuam etiologia viral, isoladamente ou em infecções mistas. A anatomia e fisiologia do trato respiratório favorecem o estabelecimento de infecções veiculadas por aerossóis, poeiras ou transmitidas por contato direto ou indireto. Dentre os fatores que favorecem as infecções respiratórias pode-se mencionar: a) a inalação contínua de grande quantidade de ar potencialmente contaminado; b) o hábito investigativo olfatório de várias espécies animais; c) a grande superfície das vias respiratórias, que se estendem desde as fossas nasais até os alvéolos pulmonares; d) a diversidade do epitélio que reveste os diferentes segmentos do trato respiratório; e) o gradiente de temperatura entre as fossas nasais (33°C) e os alvéolos (temperatura corporal), que favorece a replicação de alguns vírus; f) além dos aspectos que favorecem a replicação viral no epitélio respiratório ou em tecidos anexos, a abundância e acessibilidade do tecido linfóide e a irrigação presente nos tecidos subjacentes facilita a disseminação sistêmica desses vírus (ver Figura 8.3B). Da mesma forma, a anatomia específica do epitélio olfatório fornece uma conexão direta com o SNC, o que favorece a invasão do encéfalo por vários vírus (ex. BoHV-5). Por isso, apesar dos mecanismos naturais de defesa (muco e epitélio ciliar), o epitélio do trato respiratório é um importante local de replicação para vários vírus.

Os vírus que replicam no trato respiratório podem produzir infecções localizadas (p. ex.: vírus da influenza, vírus da parainfluenza, vírus sinciciais respiratórios) ou se disseminar a partir desse local e infectar outros órgãos e sistemas (CDV, BoHV-1 e 5 e BVDV) (ver Tabela 8.3). Alguns vírus tendem a replicar nas vias aéreas superiores, causando rinite ou rinotraqueíte (rinovírus e BoHV-1), outros replicam em segmentos intermediários, provocando traqueíte ou bronquite (vírus da influenza), enquanto outros atingem regiões mais internas e podem estar as-

sociados com bronquiolite e pneumonia (vírus sincicial respiratório bovino, BRSV).

A replicação viral no epitélio respiratório é acompanhada de edema e inflamação, resultando em interrupção da atividade ciliar, perda da integridade da camada de muco e destruição focal ou multifocal de células epiteliais. A destruição do epitélio e a perda da atividade ciliar contribuem para a colonização bacteriana secundária. O afluxo de células inflamatórias e acúmulo de transudato resultam no aumento da área desprovida de muco e na exposição da superfície celular. A infecção pode induzir a produção local de citocinas, que exacerbam o processo inflamatório e contribuem para a manifestação de sinais clínicos. Em estágios avançados, o edema da mucosa associado com o acúmulo de transudato, infiltrado inflamatório e restos celulares necróticos podem levar à redução importante do lúmen e conseqüente dificuldade respiratória. Contaminações bacterianas secundárias são freqüentes em várias infecções víricas e, muitas vezes, são as responsáveis pela severidade do quadro clínico.

Além dos vírus que produzem infecções localizadas pela sua replicação no epitélio respiratório, outros vírus utilizam esse epitélio como porta de entrada para a replicação primária e infecção de outros órgãos (ver Tabela 8.3). O BoHV-1 replica no trato respiratório e produz rinotraqueíte, mas também pode se disseminar sistemicamente e infectar o feto. O BoHV-5 e o PRV replicam no epitélio nasal e invadem o SNC, onde replicam maciçamente e provocam meningoencefalite. O BVDV pode penetrar e replicar na mucosa nasofaríngea, a partir da qual se dissemina sistemicamente e pode infectar o feto, podendo causar aborto ou malformações. O CDV também pode utilizar a replicação respiratória como etapa inicial de uma disseminação sistêmica. Os parvovírus podem atingir o epitélio intestinal ou o feto após replicação primária e disseminação a partir da mucosa orofaríngea. Nos vírus que atingem os órgãos-alvo por viremia, a replicação secundária ocorre no tecido linfóide adjacente à mucosa respiratória e também nos linfonodos regionais.

Os vírus que replicam no trato respiratório, produzindo infecções respiratórias ou sistêmicas, são excretados no muco nasal e/ou na saliva e

podem ser expelidos pela tosse, espirro, expectorações ou durante a ingestão de água e alimentos. Esses agentes são transmitidos por contato direto ou indireto e alguns podem ser veiculados por aerossóis a distâncias relativamente grandes.

3.3.4 Infecções do trato digestivo

As infecções víricas do trato gastrointestinal (TGI) são muito comuns, sendo superadas em freqüência somente pelas infecções respiratórias. A anatomia e fisiologia dos órgãos que compõem o TGI também oferecem condições favoráveis para a instalação de infecções virais. Dentre estas se destacam a exposição a uma grande quantidade de agentes ingeridos com a água e alimentos, a grande área de superfície e a existência de diferentes tipos de epitélio nos vários segmentos do TGI.

As infecções intestinais ocorrem de forma direta, pela ingestão de partículas víricas (coronavírus, rotavírus e calicivírus), ou de forma indireta, por via hematôgena após a replicação viral na orofaringe (parvovírus). Os vírus que atingem o intestino após a ingestão devem ser capazes de resistir ao pH ácido do estômago e aos sais biliares do intestino delgado para estabelecer a infecção. Após resistir a essas adversidades, o vírus deve ultrapassar a camada de muco e penetrar nas células epiteliais para iniciar a infecção.

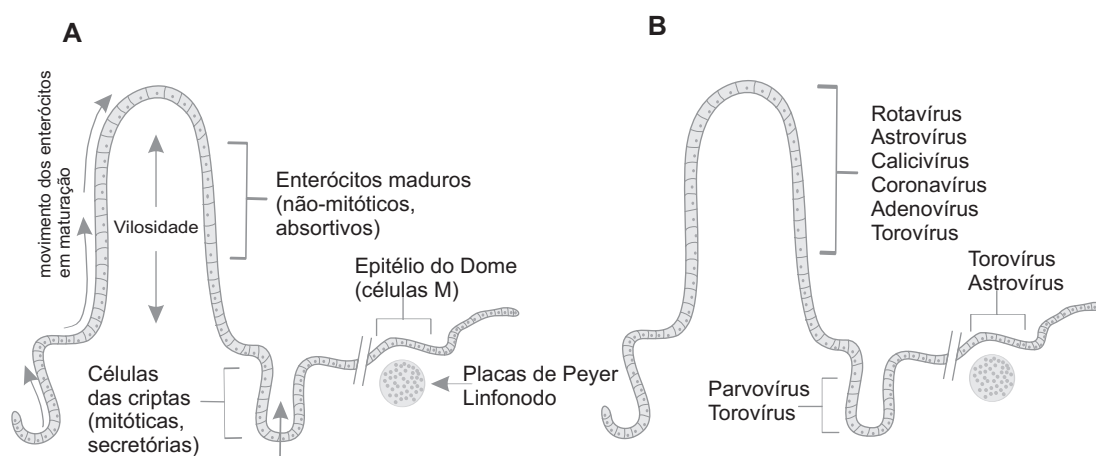
De acordo com a sua biologia, os vírus associados com infecção do TGI podem ser divididos em três grupos principais: a) os vírus associados primariamente com replicação no TGI e que causam gastroenterite (parvovírus, calicivírus, astrovírus, coronavírus e rotavírus); b) os vírus excretados nas fezes, mas que não são enteropatógenos (vários enterovírus, picornavírus, alguns adenovírus; vírus que causam hepatites); e c) vírus sistêmicos que replicam no TGI e em outros órgãos, podendo estar associados com gastroenterite (exemplo: BVDV). Infelizmente, a biologia de muitos vírus associados primariamente com gastroenterite é muito pouco conhecida, pois muitos deles não replicam bem em cultivo celular, o que dificulta o seu estudo e a produção de reagentes para o diagnóstico.

Vírus de várias famílias replicam no TGI e estão primariamente associados com doença entérica e diarreia. Embora esses agentes estejam freqüentemente associados com enterite com características clínicas semelhantes, a sua patogenia apresenta algumas diferenças importantes. A maioria desses vírus atinge o intestino pela via oral e replica nos enterócitos maduros das regiões mais altas das vilosidades do intestino delgado (ID) (Figura 8.13). Os vírus que replicam e destroem essas células provocam a redução da capacidade digestiva e absorptiva do órgão, resultando em retenção de material parcialmente ou não-digerido no lúmen intestinal. Isso leva à retenção de água, aumento de volume e fermentação excessiva nos segmentos terminais do ID e no intestino grosso, exacerbando o efeito osmótico que atrai água para o lúmen intestinal. Essa condição é conhecida como síndrome da má-absorção primária.

Os parvovírus atingem o intestino delgado pela via sangüínea, após a replicação na orofaringe. Esses vírus infectam as células das criptas intestinais, que são imaturas e se constituem nas células progenitoras dos enterócitos das vilosidades (Figura 8.13). As células das criptas são os alvos principais de replicação do CPV e FPLV, pelo fato de apresentarem uma taxa acelerada de divisão, o que favorece a replicação viral. Essas

células estão em divisão ativa, pois são encarregadas de substituir gradativamente as células das vilosidades que vão sendo esfoliadas. Com a destruição das células das criptas pela replicação viral, a substituição das células das vilosidades se torna deficiente. Isso leva também à deficiência dos processos absorptivos do ID, o que caracteriza a síndrome de má-absorção secundária. A destruição das células das criptas pela replicação viral resulta em achatamento das vilosidades e reação inflamatória severa. A destruição de enterócitos maduros leva à exposição das camadas adjacentes, hemorragia e desidratação. A presença de sangue nas fezes se constitui em um achado freqüente em várias infecções víricas intestinais, podendo estar associada com níveis importantes de mortalidade. Em ambos os casos, as vilosidades se tornam atrofiadas e achatadas, podendo ocorrer necrose progressiva e descamação.

Embora a maioria desses vírus replique preferencialmente no epitélio do ID, alguns deles podem infectar as células epiteliais das vilosidades do intestino grosso. Em geral, a replicação desses vírus fica restrita ao epitélio do intestino, com pouca ou nenhuma replicação em células da lâmina própria e tecidos subjacentes. Outros vírus infectam populações específicas de células, além das células epiteliais, como os astrovírus (células M e das placas de Peyer do ID).



Fonte: adaptada de Conner e Ramig (1997).

Figura 8.13. Ilustração simplificada da estrutura do epitélio do intestino delgado (A) e local de replicação de alguns vírus entéricos (B).

O BVDV está frequentemente associado com quadros de enterite, nos quais a replicação viral nos epitélios e/ou no tecido linfóide adjacente resulta em lesões erosivas e ulcerativas disseminadas pelo trato GI. Com certa frequência, essas lesões podem ser observadas ao longo do TGI, incluindo a língua, mucosa oral, esôfago, rúmen, abomaso e intestino delgado. Além da replicação nas células epiteliais, o caráter sistêmico do agente e a sua capacidade de replicar em células do sistema linforreticular provavelmente contribuem para a patogenia dessas lesões.

Os vírus que replicam no epitélio intestinal ou em órgãos anexos (fígado) geralmente são excretados em altos títulos nas fezes e são transmitidos principalmente pela via fecal-oral. Esses vírus são geralmente resistentes às condições ambientais, o que favorece a sua sobrevivência no ambiente e transmissão. Os vírus hepatotrópicos (p. ex.: CAdV-1 e hepadnavírus) também são excretados nas fezes. Alguns vírus replicam em órgãos anexos ao trato digestivo e são excretados pela saliva, podendo ser transmitidos por mordeduras (vírus da raiva em cães, gatos e morcegos; arnavírus entre roedores; herpesvírus B em macacos) ou pelo contato direto ou indireto com as secreções contaminadas (CDV, CAdV-1 e FMDV).

3.3.5 Infecções do sistema nervoso central

O SNC se constitui em órgão-alvo para a replicação de diversos vírus, cuja infecção é geralmente revestida de significado especial pela sua importância. Os vírus que produzem infecções neurológicas e encefalite geralmente invadem o encéfalo através dos nervos, mas vários deles podem atingir esse órgão pela via hematogênica. Os vírus que replicam em células do sistema nervoso são ditos neurotrópicos, mas a maioria deles também é capaz de replicar em outras células. Duas propriedades devem ser definidas com relação a infecção neurológica por vírus. O termo *neuroinvasividade* se refere à capacidade dos vírus atingir o SNC após a replicação em sítios periféricos. Os vírus que produzem infecções neurológicas sob condições naturais são neuroinvasivos, pois do

contrário não seriam capazes de alcançar o encéfalo após a sua penetração no hospedeiro. O termo *neurovirulência* se refere à capacidade dos vírus de replicar, disseminar-se no SNC e produzir doença neurológica. Para a maioria dos vírus que produzem infecções neurológicas, estas duas propriedades estão presentes simultaneamente. No entanto, tem sido demonstrado que alguns vírus podem ser neurovirulentos se inoculados diretamente no SNC, mas não são capazes de atingir o encéfalo após replicação em sítios periféricos. Ou seja, são potencialmente neurovirulentos, mas não neuroinvasivos. Alguns isolados do BoHV-1, por exemplo, só produzem infecções neurológicas em coelhos após a inoculação intratecal ou intracerebral, não sendo capazes de invadir o encéfalo após a inoculação intranasal ou intraconjuntival.

A via nervosa fornece um acesso direto ao encéfalo, pois os vírus são transportados ao longo de fibras conectadas sinapticamente. O transporte ao longo de axônios e dentritos e a transmissão através das sinapses permite aos vírions percorrer longas distâncias e atingir o encéfalo a partir dos sítios periféricos de replicação.

A penetração de vírus no SNC a partir do sangue oferece obstáculos adicionais, representados pela barreira hematoencefálica. Essa barreira é formada pela estrutura especializada da parede de certos capilares, que apresentam células endoteliais justapostas; pela lâmina basal espessa; pelo plexo coróide; e pelo epitélio endotelial, que não apresenta espaço entre as células. Embora estas barreiras sejam eficientes para evitar a penetração de alguns vírus no SNC, parecem não serem capazes de impedir a penetração de outros. É provável que alguns vírus consigam ultrapassar essas barreiras; outros podem infectar as células endoteliais e serem liberados na face oposta; uma minoria parece ser transportada do sangue para o tecido nervoso no interior de células sangüíneas.

Após a penetração no tecido nervoso, o vírus pode se disseminar localmente pela infecção de neurônios e células da glia localizadas nas proximidades; pode se disseminar pelos espaços intercelulares; e pode também atingir regiões mais profundas dos SNC por transpor-

te transináptico. Embora as manifestações clínico-patológicas mais importantes das infecções neurológicas devam-se a distúrbios funcionais e morte dos neurônios, uma variedade de células pode ser infectada e contribuir para as patologias observadas. Ou seja, as patologias neurológicas nem sempre são derivadas exclusivamente da infecção viral dos neurônios. Para vários vírus que produzem infecções neurológicas, as células-alvo da replicação no SNC ainda não são perfeitamente definidas. A identificação das células-alvo da replicação se constitui em um ponto-chave para o entendimento da patogenia de muitas infecções víricas neurológicas.

Os efeitos mais deletérios e mais estudados das infecções neurológicas por vírus se devem à destruição dos neurônios infectados. Dependendo do número de neurônios infectados e destruídos, esses eventos podem resultar em doença severa e na morte do hospedeiro, como ocorre em animais de laboratório infectados experimentalmente com alguns buniavírus, vírus da raiva, herpesvírus e alfavírus. A morte celular pode dever-se a uma variedade de mecanismos, muitos já descritos na seção referente às interações do vírus com as células hospedeiras (seção 2.1). A indução de apoptose em neurônios também tem sido implicada na patogenia de alguns vírus neurovirulentos. O tropismo específico do vírus por determinadas subpopulações de neurônios pode influenciar o padrão de neurovirulência e as consequências clínico-patológicas da infecção. O poliovírus, por exemplo, infecta preferencialmente neurônios do corno anterior da medula espinhal, resultando em sintomatologia característica. O buniavírus La Crosse infecta as células de Purkinje do cerebelo de camundongos infectados experimentalmente. A via de inoculação e penetração no SNC também pode determinar as características clínico-patológicas da infecção. O curso clínico e os sinais clínicos apresentados por coelhos inoculados com o BoHV-5 variam de acordo com a via de inoculação (intranasal e conjuntival), provavelmente refletindo diferentes padrões temporais e espaciais de replicação viral no encéfalo.

Embora a infecção e destruição de neurônios seja o mecanismo mais atraente – e talvez

aquele de ocorrência mais freqüente – para explicar os distúrbios neurológicos associados com as infecções víricas do SNC, a ocorrência de doença neurológica grave sem infecção neuronal maciça também tem sido descrita em infecções víricas. Isso demonstra que alguns vírus podem causar disfunção neuronal grave sem infecção ou morte de um número significativo dessas células, o que poderia explicar, em parte, os casos de recuperação clínica que eventualmente ocorram após infecções neurológicas. Em muitos casos, ocorre a infecção de um número variável de células da micróglia, de astrócitos e de oligodendrócitos, com um envolvimento pouco significativo de neurônios. É possível que produtos virais tóxicos para os neurônios sejam liberados por essas células no meio extracelular. A liberação de citocinas e outros mediadores químicos inflamatórios também têm sido implicados na disfunção neuronal observada nessas infecções. Em particular, o óxido nítrico que é produzido por células da glia em resposta à infecção vírica pode ser deletério para os neurônios. De fato, tem sido demonstrado que as interações entre células inflamatórias e neurônios podem resultar em toxicidade e disfunção neuronal, sem necessariamente induzir a morte de neurônios. Os mecanismos efetores celulares e humorais da resposta inflamatória também podem potencialmente contribuir para a injúria e disfunção neuronal. Esses mecanismos podem explicar, em parte, a ocorrência de doença neurológica severa e até mesmo fatal, desacompanhada de infecção neuronal significativa, como ocorre em algumas situações.

Além das infecções neurológicas agudas com consequências clínico-patológicas variáveis – e freqüentemente fatais – alguns vírus estabelecem infecções persistentes no sistema nervoso. Uma parte das infecções agudas resulta em morte do hospedeiro dentro de poucos dias, tendo, assim, importância epidemiológica limitada (p. ex.: encefalites eqüinas por alfavírus e flavivírus, raiva e cinomose). Por outro lado, as infecções persistentes podem ter consequências epidemiológicas mais importantes, pela perpetuação da infecção nos hospedeiros. Para estabelecer uma infecção persistente, o vírus não pode matar as células infectadas; ele deve manter a sua replica-

ção em níveis baixos e possuir estratégias para escapar da vigilância do sistema imunológico. De fato, nessas infecções, a extensão da injúria e lesões é geralmente muito pequena ou mesmo ausente. Por outro lado, a persistência viral em células nervosas é frequentemente associada com imunopatologia em neurônios e células da glia.

O SNC apresenta características que podem favorecer a persistência de infecções víricas, entre elas: possui uma população estável e heterogênea de células susceptíveis a vários vírus; uma rede intrincada de processos (axônios e dendritos) que permite a disseminação do vírus a longas distâncias; uma barreira hemato-encefálica que restringe o acesso de linfócitos T e anticorpos. No entanto, alguns vírus infectam concomitantemente células extraneurais e produzem viremia crônica, indicando que o SNC pode não oferecer todas as condições para a persistência viral.

As infecções persistentes do SNC podem ser classificadas em três tipos principais, com consequências clínico-patológicas e epidemiológicas diferentes: infecções latentes, infecções crônicas defectivas e infecções crônicas produtivas. Os alfa herpesvírus (PRV, BoHV-1, BoHV-5 etc.) estabelecem infecções latentes em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos próximos ao sítio de infecção primária. Durante a infecção latente, o genoma do vírus permanece inativo no núcleo dos neurônios, sem expressão gênica ou produção de progênie viral. Ocasionalmente, em situações de estresse, o vírus retoma a replicação ativa e é transportado de volta aos sítios de penetração, onde replica e é excretado. A reativação da infecção é importante na epidemiologia desses vírus, pois permite a excreção e transmissão a outros animais. Algumas vezes a reativação é acompanhada de recrudescência clínica, com o desenvolvimento de lesões no sítio de penetração, e também com o desenvolvimento esporádico de infecção neurológica e meningo-encefalite (BoHV-5). Cães que se recuperam da infecção aguda pelo CDV – acompanhada ou não de sinais clínicos – podem ficar portadores do vírus, que segue replicando em níveis muito baixos no SNC, geralmente desacompanhado de excreção viral. Eventualmente esses animais desenvolvem um quadro de encefalite viral e vão a óbito, mas

essa ocorrência pode demorar anos. A persistência do vírus no SNC, após a infecção aguda, pode ser favorecida por mutações que resultem na produção de vírus defectivos. Outra forma de infecção persistente no SNC é a estabelecida pelo retrovírus MVV, nos quais o vírus estabelece infecção crônica em células da linhagem macrofágica com produção de vírus ausente ou esporádica. O vírus da doença de Borna (BDV) de eqüinos também estabelece infecção persistente no sistema nervoso, porém a produção de vírus parece ser contínua, apesar de ocorrer em níveis baixos.

3.3.6 Infecções do sistema linforreticular e hematopoiético

Vários vírus utilizam células linforreticulares e/ou da linhagem hematopoiética como alvos de replicação em infecções naturais. A variedade de tipos celulares e a multiplicação contínua de algumas dessas células favorecem a replicação desses vírus. Da mesma forma, a contínua recirculação dessas células – especialmente os linfócitos – favorece o caráter sistêmico dessas infecções. Em geral, a infecção se inicia nos órgãos linfóides secundários, após a drenagem da linfa dos tecidos ou com a passagem do sangue pelo baço. Os vírus presentes na linfa e/ou sangue são capturados por ou infectam células da linhagem monocítica/macrofágica, células dentríticas ou linfócitos dos linfonodos, baço, placas de Peyer e outros acúmulos linfóides. A replicação viral nessas células é seguida da produção de progênie viral que infecta um número adicional de células próximas, além de permitir a sua disseminação sistêmica através de células circulantes. Assim o vírus pode se distribuir por outros órgãos linforreticulares e se disseminar nesses tecidos. Infecções de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea podem ocorrer nesses estágios da infecção. Os macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B são alvos de replicação de uma variedade de vírus que causam doenças em animais. Além dessas, células progenitoras da linhagem linfóide, mielóide ou hematopoiética da medula óssea podem ser infectadas por alguns vírus e comprometer a reposição das células sangüíneas (alguns vírus induzem trombocitopenia).

A infecção maciça do sistema linforreticular freqüentemente leva à depleção linfóide e disfunção da resposta imunológica. A disfunção do sistema imunológico pode resultar em deficiências na resposta a outros patógenos, com predisposição a infecções secundárias. Vários vírus animais têm sido associados com infecção do sistema linfóide e indução de imunossupressão, incluindo o vírus da doença de Gumboro em aves (IBDV), o FIV e o vírus da imunodeficiência bovina (BIV). Outros vírus, como o BVDV, CSFV, CDV e CPV podem estar associados com quadros transitórios de supressão imunológica. A imunossupressão produzida por esses vírus pode dar-se em razão de vários mecanismos e será abordada em seção específica.

Alguns dos vírus mais virulentos para humanos e animais estão associados com infecções do tecido linforreticular e hematopoiético, incluindo o vírus ebola (filovírus), arnavírus, hantavírus, o vírus da febre do vale Rift (um bunivírus), o VEEV, CSFV e ASFV. Esses vírus estão associados com doença severa, caracterizada pelo curso agudo e pela ocorrência de lesões vasculares, disfunções hemodinâmicas, de coagulação sangüínea e ocorrência de eventos hemorrágicos. Alguns isolados do BVDV também têm sido associados com doença aguda severa acompanhada de componentes hemorrágicos. Essas enfermidades possuem algumas características em comum, como o curso agudo, a ocorrência de alterações vasculares, lesões endoteliais com perda de líquido vascular, proteinúria e edemas. As manifestações mais comuns da injúria nos endotélis vasculares incluem hiperemia acentuada, petéquias e sufusões nas mucosas e serosas, equimoses e hemorragias pontuais disseminadas em quadros severos. Quadros de choque hipovolêmico são freqüentes em estágios avançados da doença. As hemorragias e extravasamento de plasma podem ser por causa da injúria nos endotélis vasculares pela replicação viral nas células endoteliais, por alterações na coagulação sangüínea (coagulação intravascular disseminada com consumo de plaquetas) ou ainda por trombocitopenia primária.

3.3.7 Infecção fetal

Os tecidos embrionários e fetais apresentam uma alta taxa de multiplicação celular e, por isso, constituem-se em sítios de predileção para a replicação de vários vírus. Os vírus que infectam o feto se disseminam pela via hematogênica e vários deles produzem infecções inaparentes ou leves nas fêmeas prenhes. Nesses casos, as consequências maiores da infecção são devidas às perdas reprodutivas. As consequências da infecção fetal variam com a espécie e cepa do vírus, com o *status* imunológico da fêmea e com a fase de gestação em que ocorre a infecção. As infecções que ocorrem em fases precoces da gestação são geralmente acompanhadas de morte embrionária ou fetal. Infecção fetal em estágios intermediários pode produzir teratogenia ou abortos e infecção em fases avançadas pode induzir abortos, natimortos ou resultar em resposta imunológica e erradicação da infecção pelo feto.

A infecção fetal também pode representar um meio para o vírus persistir na população, pela geração de animais imunotolerantes e persistentemente infectados, capazes de disseminar o vírus por longos períodos. A produção de neonatos persistentemente infectados é característica da infecção fetal por cepas não-citopáticas do BVDV entre os 40 e 120 dias de gestação, e pode ocorrer também com os pestivírus suíno e ovino. Os efeitos da infecção fetal pelo BVDV estão ilustrados na Figura 8.14.

Os efeitos observados no feto podem dever-se à replicação viral nos tecidos fetais e/ou replicação na placenta e interferência com as funções placentárias. A mortalidade fetal pode ser seguida de reabsorção, mumificação fetal ou abortamento. Os abortos associados com infecções víricas geralmente ocorrem dias ou semanas após a infecção, o que dificulta a detecção de vírus e/ou produtos virais nos tecidos fetais e conseqüentemente o diagnóstico.

Dentre os vírus animais que produzem infecções embrionárias e fetais destacam-se:

- herpesvírus de várias espécies: mortalidade fetal, abortos, doença ou mortalidade neonatal;
- pestivírus de bovinos (BVDV), suínos (CSFV) e ovinos (*border disease virus* – BDV): mortalidade fetal, abortos, malformações, natimortalidade, nascimento de animais persistentemente infectados;
- vírus da língua azul (BTV, um orbivírus) em ovinos e bovinos: mortalidade fetal, abortos, malformações congênitas;
- parvovírus suíno (PPV): reabsorção embrionária, mortalidade fetal, abortos, mumificação, natimortalidade;
- vírus da panleucopenia felina (FPLV): hipoplasia cerebelar;

- vírus da leucemia felina (FeLV): leucemia, mortalidade fetal;
- vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) e vírus da arterite viral eqüina (EAV): mortalidade fetal, abortos;
- vírus Akabane (ovinos e bovinos): morte fetal, abortos, malformações, natimortalidade;
- vírus da febre do vale Rift (RVFV) em ovinos: mortalidade fetal e abortos.

Perdas reprodutivas por alguns desses agentes também têm sido relatadas após o uso de vacinas atenuadas contendo os respectivos agentes. Por outro lado, para os vírus que causam perdas reprodutivas importantes, a vacinação deve ser realizada antes da cobertura ou inseminação para prevenir a infecção fetal e, assim, minimizar as perdas.

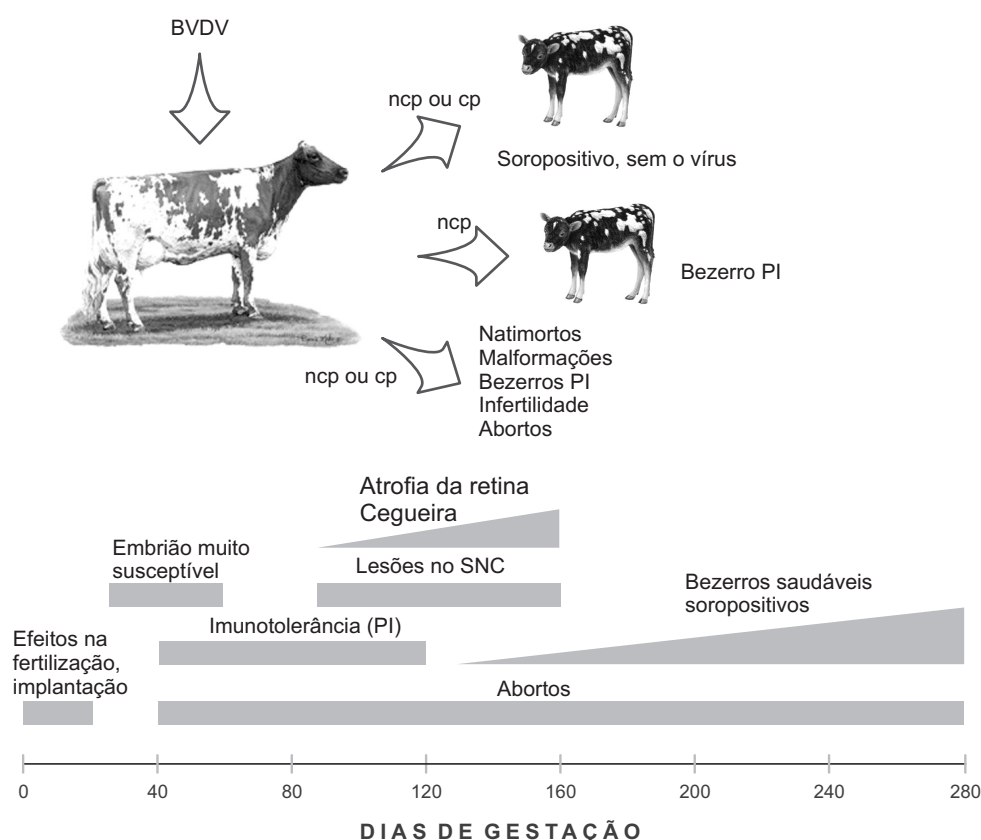


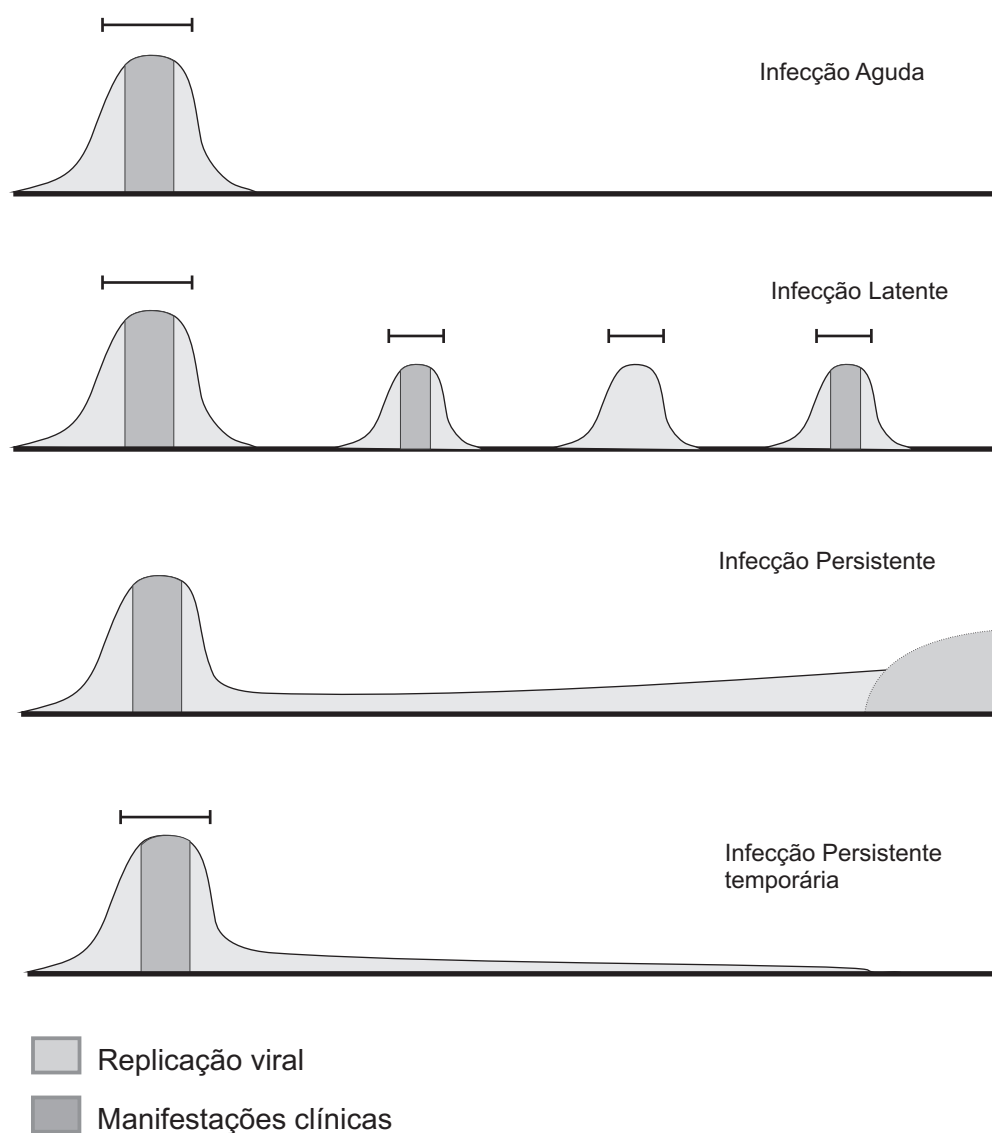
Figura 8.14. Efeitos da infecção de fêmeas bovinas prenhes pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). As conseqüências da infecção dependem do status imunológico da fêmea, da cepa do vírus (biotipo e virulência) e do estágio de desenvolvimento do embrião/feto.

4 Padrões principais de infecção

A sobrevivência dos vírus como espécie depende de infecções sucessivas e contínuas de diferentes indivíduos e/ou de infecções prolongadas no mesmo indivíduo. Por outro lado, o resultado da infecção viral em um animal depende de interações múltiplas entre componentes virais e do hospedeiro. Objetivamente, depende do balanço entre as estratégias virais para se perpetuar no organismo e dos mecanismos de defesa do hospedeiro para erradicar o agente. Apesar da diversidade dos vírus e da complexidade de suas interações com os hospedeiros, dois padrões

principais de infecção podem ser reconhecidos: as infecções agudas e as infecções crônicas (ou persistentes). No entanto, variações e combinações desses tipos também ocorrem com frequência (Figura 8.15).

Alguns vírus produzem *infecções agudas*, que se caracterizam pela curta duração e rápida erradicação do agente pela resposta imunológica do hospedeiro. Outros vírus produzem infecções *persistentes* ou *crônicas*, caracterizadas pela permanência do agente no hospedeiro por longos períodos, muitas vezes pelo resto da vida. A natureza autolimitante das infecções agudas se deve principalmente à eficiência do sistema imunoló-



Fonte: adaptada de Flint et al. (2000).

Figura 8.15. Principais padrões de infecção.

gico do animal em combater e erradicar a infecção. Visto por outro ângulo, o caráter transitório dessas infecções se deve à incapacidade dos vírus persistir no animal na presença da resposta imunológica. As infecções persistentes ou crônicas também podem ser vistas sob duas óticas: a) do ponto de vista do hospedeiro, a persistência do agente em seus tecidos reflete a incapacidade do sistema imunológico de erradicá-lo; e b) do ponto de vista do agente, a persistência é o resultado de estratégias evolutivas, que foram desenvolvidas para se adaptar ao hospedeiro e escapar da vigilância do sistema imunológico, garantindo, assim, a sua permanência no animal.

4.1 Infecções agudas

A principal característica das infecções agudas é o curto período de tempo em que o vírus replica no organismo do hospedeiro. É o padrão de infecção mais estudado e conhecido e é característico de vários vírus que replicam com eficiência em animais e em cultivos celulares. O termo *aguda* se refere à rapidez de replicação e produção de progênie viral, que é seguida também por uma rápida resolução e erradicação da infecção. Os níveis de replicação viral no organismo aumentam rapidamente, atingem um pico após alguns dias e decrescem também com certa rapidez (Figura 8.15). A redução dos níveis de vírus no organismo coincide com o desenvolvimento de resposta imunológica humoral (anticorpos) e celular (linfócitos T citotóxicos). Em geral, a resposta imunológica é capaz de erradicar o agente dos tecidos após alguns dias. Se, por um lado, o curto período de replicação e excreção pode ser detrimental para a sobrevivência do vírus na população, os altos títulos de vírus que são excretados favorecem a transmissão do agente.

É importante ressaltar que o termo *aguda* se refere à cinética de replicação viral (níveis e tempo) e não às manifestações clínicas. De fato, muitas infecções agudas são absolutamente subclínicas, ou seja, são desacompanhadas de manifestações clínico-patológicas. Não obstante, muitas vezes as infecções agudas não podem ser controladas pelo sistema imunológico e resultam em doença de severidade variável, algumas vezes fatais. Exemplos de infecções agudas incluem as infec-

ções entéricas por rotavírus em várias espécies, vírus da influenza em suínos e eqüinos, vírus da raiva em várias espécies, CPV, entre outras.

4.2 Infecções persistentes ou crônicas

As infecções crônicas ou persistentes se caracterizam pela persistência do vírus ou do genoma viral no hospedeiro por longos períodos. A maioria dessas infecções se inicia como uma infecção aguda, caracterizada por uma rápida replicação viral, acompanhada ou não de sinais clínicos. No entanto, ao contrário das infecções agudas, a resposta imunológica montada pelo hospedeiro não é capaz de erradicar o agente, resultando na sua permanência nos tecidos por períodos variáveis. Diferentes tipos de infecções crônicas podem ser reconhecidos de acordo com a biologia do agente, com a dinâmica de replicação viral (ausência ou presença de replicação ativa) e com a duração. Em geral, os níveis de replicação e excreção viral nas infecções crônicas são muito mais baixos do que nas infecções agudas e, algumas vezes, podem ser dificilmente detectáveis.

De acordo com a ocorrência ou não de replicação viral durante a persistência, dois tipos principais de infecções crônicas são reconhecidos: as infecções *latentes* e as infecções *persistentes*. As infecções latentes são caracterizadas pela permanência do genoma viral nas células do hospedeiro, na maior parte do tempo sem replicação e produção de vírus. A replicação e produção de progênie viral somente ocorrem em situações esporádicas e duram horas ou poucos dias. Já nas infecções persistentes, a replicação viral ocorre de forma contínua, em níveis variáveis, e é frequentemente acompanhada de excreção do agente. Em algumas infecções persistentes, no entanto, os níveis de replicação são tão baixos – e em determinados tecidos do organismo – que não são acompanhados de excreção viral detectável (p. ex.: persistência do CDV no encéfalo de cães adultos e persistência do FMDV na faringe). Em outras, a replicação e excreção viral ocorrem de forma contínua e em níveis significativos.

As infecções persistentes – aquelas que cursam com replicação viral contínua – podem ser agrupadas em duas classes, que são determinadas pela biologia dos vírus e por suas interações

com o hospedeiro. Para alguns vírus, o estabelecimento de infecção persistente é uma regra e ocorre em, virtualmente, todos os indivíduos infectados. Em outras palavras, a persistência é uma característica biológica inerente às relações daquele vírus com os seus hospedeiros. Esse tipo de infecção persistente se prolonga por tempo indeterminado, provavelmente por toda a vida do animal. Essas são as *infecções persistentes clássicas* e são características das infecções pelos retrovírus animais, além de outros vírus. Em outros grupos de vírus, infecções persistentes podem ser estabelecidas após a infecção aguda, em um número variável de indivíduos, e a persistência geralmente possui duração variável, não necessariamente indefinida. Nesses casos, a persistência é uma consequência provável – e muitas vezes freqüente – da infecção, mas não se constitui em regra ou padrão biológico da infecção por esses vírus. Além disso, grande parte dos animais que se tornam portadores consegue erradicar a infecção após algum tempo, determinando o fim da persistência, ou seja, são *infecções persistentes temporárias* (Figura 8.15).

Algumas infecções persistentes são acompanhadas de sinais clínicos crônicos, que podem ser brandos ou graves; outras vezes a infecção é absolutamente inaparente. Várias infecções crônicas resultam em patologias progressivas de desenvolvimento lento (MVV, CAEV, vírus da pneumonia progressiva dos ovinos [OPPV] e FeLV), em imunopatologia ou imunodeficiência (EIAV, FIV e LCMV) ou no desenvolvimento de neoplasias malignas (vírus da leucose aviária [ALV] e BLV). Essas patologias são mais comumente observadas nas infecções persistentes clássicas.

Os locais de persistência do vírus não são necessariamente os mesmos em que o vírus replicou e produziu patologias na fase aguda e, freqüentemente, incluem sítios de acesso restrito do sistema imunológico. Os padrões de replicação e excreção viral durante as infecções crônicas também são muito variáveis. Em algumas infecções, a replicação viral é contínua e ocorre em níveis moderados a altos; em outras, os níveis de replicação são muito baixos, com pouca ou nenhuma excreção viral. Já as infecções latentes são caracterizadas por longos períodos de absoluta ausência de replicação viral intercaladas com episódios esporádicos de reativação, replicação e excreção viral.

4.2.1 Infecções latentes

Esse tipo de infecção é típico dos alfa herpesvírus animais (BoHV-1, BoHV-5, PRV, EHV-1, herpesvírus canino, herpesvírus felino, entre outros) e se caracteriza pela permanência do genoma viral inativo em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos após o término da replicação na fase aguda. Durante a infecção latente não ocorre produção de proteínas virais, replicação do genoma ou produção de partículas víricas. Com isso, os neurônios que abrigam o genoma viral não são reconhecidos como infectados pelo sistema imunológico, o que permite ao vírus escapar da vigilância imunológica. O genoma viral não é integrado aos cromossomos celulares e permanece como um episomo, fortemente associado com proteínas celulares no núcleo dos neurônios. Esporadicamente, geralmente associado com situações de estresse e produção de glicocorticóides endógenos, a infecção é reativada e o vírus replica de forma aguda e é excretado. O período e a magnitude de excreção viral durante a reativação são geralmente bem inferiores àqueles observados durante a infecção aguda. A reativação da infecção ocasionalmente é acompanhada de manifestações clínicas, geralmente mais brandas do que aquelas observadas durante a infecção aguda. As reativações ocorrem a intervalos variáveis (semanas, meses, anos) em uma parcela dos indivíduos e é possível que alguns hospedeiros não apresentem episódios de reativação. A infecção latente representa um meio do vírus se perpetuar no hospedeiro, e a sua reativação periódica permite a sua excreção e transmissão.

4.2.2 Infecções persistentes ou crônicas

Essas infecções se caracterizam pela contínua replicação e produção de partículas víricas nos tecidos do hospedeiro por tempo ilimitado, provavelmente por toda a vida do animal. É possível se detectar o agente infeccioso em qualquer momento após a infecção aguda, desde que se examinem os tecidos certos com técnicas apropriadas. As infecções persistentes se estabelecem porque o sistema imunológico do hospedeiro não consegue erradicar o vírus durante a infecção

aguda. Subseqüentemente, por diferentes mecanismos, o agente consegue coexistir com uma resposta imune que mantém um controle parcial da infecção, sem conseguir eliminá-la totalmente. Os níveis de replicação nesse tipo de infecção variam de acordo com o vírus. Alguns vírus mantêm níveis consideráveis de replicação de forma contínua; outros apresentam uma replicação mínima, às vezes, de difícil detecção. As infecções pelos retrovírus animais (EIAV, BLV, FeLV, CAEV, entre outras), BTV e infecção persistente pelo BVDV são exemplos clássicos de infecções víricas persistentes.

No caso dos retrovírus, a manutenção da infecção se deve à integração definitiva de cópias DNA do genoma viral nos cromossomos das células hospedeiras, ou seja, as células infectadas ficam persistentemente infectadas e, caso se multipliquem, transmitem o genoma viral para a sua progênie. Assim, gerações sucessivas de células produzem vírus infecciosos ao longo da vida do animal. No caso do BLV, a manutenção da infecção persistente deve-se principalmente a divisões celulares contínuas e transmissão do genoma viral para a progênie, do que à produção de vírus infecciosos. É interessante observar que os retrovírus, além de inserir o seu material genético nos cromossomos do hospedeiro, também sofrem contínuas mutações que contribuem para a sua perpetuação no animal infectado.

As infecções persistentes pelo BVDV somente ocorrem em animais que tenham sido infectados intra-uterinamente, entre os 40 e 120 dias de gestação. Esses animais se tornam imunotolerantes e são incapazes de montar uma resposta imunológica contra o vírus infectante. Assim, o vírus pode replicar continuamente em altos títulos no tecido linforreticular e epitélios dos animais, sem a interferência do sistema imunológico.

4.2.3 Infecções persistentes temporárias

Em alguns vírus, a infecção aguda pode ser seguida de persistência do agente nos tecidos do hospedeiro por períodos variáveis. Em algumas delas, a persistência ocorre apenas em alguns animais, não se constituindo em uma regra. Em

outros casos, as infecções crônicas que se seguem às infecções agudas parecem ocorrer na maioria, senão em todos os animais. Os níveis de replicação e excreção viral variam de acordo com o agente e com a resposta do hospedeiro. A duração da persistência também é variável, podendo ser de meses e até anos (ou até mesmo por toda a vida do animal). Naqueles casos em que a erradicação do agente ocorre após algum tempo, é provável que o vírus tenha esgotado o seu arsenal de estratégias para persistir no animal, sendo eventualmente combatido pelo sistema imune. Vários vírus produzem este tipo de infecção. O PRRSV permanece replicando nos testículos de reprodutores suínos por até seis meses após a infecção aguda. O CAdV-1 também pode permanecer durante meses replicando no epitélio dos túbulos renais, que são locais de acesso restrito do sistema imunológico. A infecção pelo CDV é um exemplo de infecção que é geralmente aguda – na maioria dos animais – mas pode se tornar crônica em uma parcela dos cães que não conseguem erradicar o vírus na fase aguda. Nesses animais, o vírus persiste replicando em níveis baixos no SNC. Essa replicação não é acompanhada de excreção viral em secreções ou excreções. A maioria desses animais eventualmente desenvolve doença neurológica de curso fatal, em um prazo que varia de meses a anos. No caso do calicivírus felino (FCV), a persistência do vírus no hospedeiro parece ser favorecida pela ocorrência contínua de mutações genéticas que resultam em variantes virais que escapam da resposta imune do animal. O FMDV produz uma infecção clínica aguda (febre aftosa) que se resolve em poucos dias. No entanto, uma parcela dos animais permanece abrigando o vírus na faringe por um determinado tempo. Os níveis de replicação são geralmente muito baixos e parecem não ser acompanhados de excreção viral.

Alguns arenavírus e hantavírus produzem infecções crônicas em roedores silvestres. Essas infecções são acompanhadas por viremia prolongada – muitas vezes por toda a vida – e de transmissão vertical do vírus para a progênie. Já as infecções crônicas por hantavírus são caracterizadas por viremia transitória seguida de excreção prolongada de vírus pela saliva, secreções nasais, fezes e urina. Esses vírus podem ser ocasional-

mente transmitidos para humanos e são importantes causas de febres hemorrágicas. A Tabela

8.4 apresenta as principais características das infecções virais persistentes.

Tabela 8.4 Sítios de persistência de vírus que estabelecem infecções latentes ou persistentes nos hospedeiros

Tipo	Família/subfamília	Vírus	Espécie	Local de persistência
Latente	<i>Herpesviridae/Alphaherpesvirinae</i>	BoHV-1	bovina	Gânglios sensoriais e autonômicos, tonsilas e linfócitos T (BoHV-1.1), linfonodos da região sacral (BoHV-1.2).
		BoHV-5	bovina	Gânglio trigêmeo e sítios do SNC.
		BoHV-2	bovina	Gânglio trigêmeo, pele e linfonodos.
		CaHV-1	canina	Gânglios sensoriais e autonômicos.
		FHV-1	felina	Gânglios sensoriais e autonômicos.
		CpHV	caprina	Gânglios sensoriais e autonômicos.
		PRV	suína	Gânglio trigêmeo, bulbo olfatório, tronco cerebral, medula espinhal, tonsilas.
		EHV-1, 3 e 4	equina	Gânglios sensoriais e autonômicos.
		GaHV-1	aves	Gânglios sensoriais e autonômicos.
	<i>Herpesviridae/Betaherpesvirinae</i>	PCMV (SHV-2)	suína	Glândula salivar, epitélio vesical e células mononucleares.
Persistente	<i>Herpesviridae/Gammaherpesvirinae</i>	MCFV (AHV-1)	ruminantes	Células linfoblastóides.
		EHV-2 e 5	equina	Células linfoblastóides.
	<i>Adenoviridae</i>	DAdV-A	aves	Células da glândula da casca e do oviduto.
	<i>Retroviridae</i>	BLV	bovina	Linfócitos B.
		Maedi/ Visna	ovina	Monócitos e macrófagos.
		CAEV	caprina	Linfócitos, SNC, epitélio alveolar, monócitos e macrófagos.
		FIV/FelV	felina	Células mielóides, linfócitos T e B.
		EIAV	equina	Macrófagos e linfócitos.
		ALV	aves	Células linfóides, mielóides, renais, ósseas, endoteliais e mesenquimais.
		Vírus Jaagsiekte OPAV	ovina	Células epiteliais do sistema respiratório.
	<i>Coronaviridae</i>	FIPV	felina	Macrófagos.
	<i>Paramyxoviridae</i>	CDV*	canina	SNC (oligodendrócitos).
	<i>Caliciviridae</i>	FCV	felina	Epitélio respiratório e anexos.
	<i>Flaviviridae</i>	BVDV, BDV e CSFV**	bovina, ovina e suína	Células do sistema imune, SNC, medula óssea, células endoteliais e células epiteliais dos sistemas respiratório e digestório.
	<i>Alphaherpesvirinae</i>	MDV (GaHV-2)	aves	Linfócitos T.
	<i>Adenoviridae</i>	EAdV-2	equina	Mucosa respiratória, adenóides.
	<i>Parvoviridae</i>	PPV***	suína	Tecido linfóide, rins e testículos.
	<i>Reoviridae</i>	BTV	bovina e ovina	Células hematopoiéticas.
	<i>Hepadnaviridae</i>	DHBV, WHBV, GSHBV	patos, gansos, marmotas, esquilos ovinos	Hepatócitos.

Tabela 8.4 Continuação

Tipo	Família/subfamília	Vírus	Espécie	Local de persistência
Persistente temporária	<i>Papillomaviridae</i>	BPV-1 a 7	bovina	Células epiteliais.
		CaPV	canina	Células epiteliais.
		EPV-1 e 2	equina	Células epiteliais.
	<i>Adenoviridae</i>	CAdV-1	canina	Epitélio dos túbulos renais.
	<i>Asfarviridae</i>	ASFV	suína e bubalina	Células mononucleares e fagocíticas, tonsilas e linfonodos.
	<i>Circoviridae</i>	PCV-1 e 2	suína	Células mononucleares sangüíneas, macrófagos e linfócitos.
	<i>Picornaviridae</i>	FMDV	bovina, suína e ovina	Mucosa da orofaringe.
	<i>Arteriviridae</i>	PRRSV	suína	Macrófagos, células germinativas dos testículos.
		EAV	equina	Macrófagos, células endoteliais e mesoteliais.
	<i>Coronaviridae</i>	TGEV	suína	Mucosas respiratória e intestinal.
		IBV	aves	Células do epitélio renal.
	<i>Bornaviridae</i>	BDV	equina	Neurônios, astrócitos e oligodendrócitos.

* Alguns animais que se recuperam da doença ficam portadores, mas não excretam o vírus, que replica em níveis baixos no SNC.
 **Fetos infectados em determinada fase de gestação ficam imunotolerantes e nascem persistentemente infectados.
 ***Alguns fetos infectados no útero se tornam imunotolerantes e ficam portadores, excretando o vírus por longos períodos.

4.3 Mecanismos envolvidos na manutenção das infecções persistentes

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento e manutenção das infecções persistentes são muito complexos e pouco esclarecidos até o presente. No entanto, independentemente dos mecanismos responsáveis, a manutenção de uma infecção vírica no organismo deve preencher três condições essenciais: a) a infecção celular deve ser não-citolítica (ou de citopatogenicidade limitada); b) manutenção do genoma viral nas células do hospedeiro, e c) evasão da resposta imune do hospedeiro. Vários mecanismos adicionais ou complementares têm sido sugeridos para explicar a persistência desses agentes em tecidos do hospedeiro, por longos períodos, a despeito da resposta imunológica desencadeada contra eles. É provável que nenhuma infecção persistente seja mantida por causa de apenas um desses mecanismos; ao contrário, provavelmente são mantidas pela combinação de vários deles.

4.3.1 Restrição do efeito citopatogênico

Os vírus que produzem infecções não-citolíticas são mais propensos a estabelecerem infecções persistentes, pois a sua replicação não resulta na destruição das células infectadas (ou resulta em destruição limitada). Exemplos de vírus não-citolíticos que causam infecções persistentes são alguns arenavírus (infecção renal persistente em roedores), o BVDV (infecção de células do sistema linforreticular) e o vírus da hepatite B (infecção não-citolítica de hepatócitos).

4.3.2 Infecção de células semipermissivas

A replicação dos alfa herpesvírus em células epiteliais e do tegumento é altamente citolítica, o que também é observado em uma variedade de células *in vivo* e *in vitro*. A infecção também é citolítica em vários tipos de neurônios. No entanto, alguns neurônios sensoriais e autonômicos não são permissivos à replicação lítica aguda. Como

consequência, após penetrar e ter o seu ciclo replicativo interrompido, o vírus estabelece infecções latentes nesses neurônios, ou seja, a infecção de células semi-permissivas à infecção lítica é o mecanismo responsável pela persistência dos alfa herpesvírus nos seus hospedeiros. Sob determinadas condições, esses neurônios que abrigam o genoma viral se tornam permissivos, o que desencadeia a reativação e replicação viral.

4.3.3 Infecção de um pequeno número de células

Essa forma de infecção tem sido observada por alguns vírus *in vitro* e é possível que também ocorra *in vivo*. Candidatos para esse tipo de modulação são os adenovírus e os arterivírus (EAV em eqüinos e PRRSV em suínos). A infecção persistente no hospedeiro seria mantida através de infecções sucessivas – citolíticas ou não – de um número pequeno de células a cada ciclo. Os vírus produzidos por essas células infectariam outra pequena população de células e, assim, a infecção se prolongaria sucessivamente. Provavelmente algum mecanismo concomitante de evasão do sistema imune seja necessário para permitir a ocorrência dessas infecções continuadas, mesmo em baixos níveis.

4.3.4 Manutenção do genoma viral nas células hospedeiras

A manutenção do genoma viral nas células do hospedeiro pode ocorrer por dois mecanismos distintos: pela integração do genoma viral nos cromossomos da célula do hospedeiro, como ocorre com as infecções pelos retrovírus, ou pela manutenção do genoma como elemento extracromossomal no núcleo da célula, como ocorre nas infecções latentes pelos alfa herpesvírus e papilomavírus.

4.3.5 Evasão da resposta imune do hospedeiro

As estratégias de evasão do sistema imunológico estão entre os mecanismos mais importantes utilizados pelos vírus para assegurar a sua per-

sistência no hospedeiro. Em muitos vírus, essas estratégias provavelmente complementam os outros mecanismos envolvidos na permanência do agente no organismo. Os mecanismos mais utilizados pelos vírus para evasão da resposta imune são: a) restrição de produção das proteínas virais (como no caso da latência dos herpesvírus); b) infecção de locais imunologicamente privilegiados (p. ex.: infecção das células do SNC pelo CDV e de células do epitélio seminífero dos testículos pelo PRRSV); c) variação antigênica (EIAV, FCV e FMDV); d) tolerância imunológica (bovinos persistentemente infectados pelo BVDV); f) interferência com células e moléculas do sistema imunológico (adenovírus e poxvírus).

5 Oncogênese por vírus

A transformação celular e produção de tumores estão entre as consequências da replicação de alguns grupos de vírus nos seus hospedeiros. De fato, acredita-se que uma parte considerável dos tumores de humanos e animais possua a participação direta ou indireta de agentes virais. De acordo com o vírus, diferentes tipos celulares e órgãos podem ser afetados, com consequências diversas. Alguns tumores induzidos por vírus são benignos, mas uma parcela importante é constituída por neoplasias malignas que resultam em doença progressiva e morte do animal. Para alguns vírus indutores de tumores, os mecanismos moleculares de oncogênese já foram razoavelmente esclarecidos. Para outros vírus, no entanto, esses mecanismos permanecem obscuros e se constituem em temas de contínuas investigações. Dentre os vírus animais associados com neoplasias, encontram-se famílias de vírus RNA (retrovírus) e DNA (poliomavírus, papilomavírus, adenovírus e hepadnavírus).

5.1 Oncogênese por retrovírus

Os retrovírus envolvidos com a produção de tumores – também chamados de *oncornavírus* – são amplamente distribuídos na natureza e têm sido isolados de virtualmente todas as espécies animais. Esses vírus diferem entre si em relação ao tropismo celular, potencial oncogênico, perí-

odo de incubação e mecanismo de oncogênese. Com base no tempo necessário para a produção dos tumores, os oncornavírus podem ser divididos em vírus transformantes não-agudos, agudos e transindutores. Os retrovírus transformantes não-agudos induzem a formação de neoplasias após um longo período de incubação (meses até décadas), assim como os transindutores. Os retrovírus transformantes agudos induzem tumores em um intervalo menor de tempo (semanas). Os mecanismos de oncogênese também variam entre os grupos.

Os retrovírus transformantes não-agudos estão envolvidos em vários tipos de neoplasias, incluindo linfomas e leucemias. Esses vírus não possuem genes específicos com atividade oncogênica no seu genoma. Ao contrário, induzem oncogênese pela integração do seu genoma (provírus DNA) nas proximidades de proto-oncogenes celulares ou de genes envolvidos no controle do ciclo e diferenciação celular. Com isso, a expressão desses genes é alterada e pode levar à transformação tumoral. Este processo é denominado de oncogênese insercional.

Os retrovírus transformantes agudos podem induzir a formação de tumores dentro de poucos dias. Ao contrário do grupo anterior, esses vírus possuem oncogenes (genes oncogênicos) no seu genoma. Mais de 30 diferentes oncogenes já foram identificados no genoma de retrovírus animais e todos eles parecem ter sido adquiridos – integralmente ou por rearranjos – do genoma dos hospedeiros em infecções passadas. As funções dos produtos desses oncogenes são variáveis e incluem desde quinases até fatores de transcrição. Uma característica comum a quase todos os oncogenes retrovirais identificados até o presente é que os seus produtos estão envolvidos em mecanismos de sinalização intracelular (*signal transduction*). Retrovírus com essas características já foram identificados em várias espécies animais e têm sido associados com uma grande variedade de tumores, incluindo sarcomas, carcinomas e linfomas em aves; sarcomas e linfomas em roedores; fibrossarcomas e linfossarcomas em felinos; e sarcoma em primatas.

Os retrovírus transformantes transindutores produzem leucemias monoclonais de linfócitos T

e B após um longo período de incubação. Entre esses vírus se destacam o vírus da leucemia de linfócitos T humano (HTLV) e o BLV. O genoma desses vírus não possui oncogenes e o mecanismo de indução da oncogênese difere daqueles dos dois grupos anteriores. A transformação tumoral induzida por esses vírus parece estar ligada à função dos produtos de dois genes acessórios, *tax* e *rex*, que também possuem papel importante no ciclo replicativo do vírus. A proteína *Rex* é essencial para o ciclo replicativo lítico do HTLV, mas a sua participação na oncogênese permanece desconhecida. Já a proteína *Tax* é necessária para o ciclo lítico e também para a transformação tumoral das células hospedeiras. Esta proteína é um potente transativador de transcrição do provírus viral e também de vários genes celulares. Já foi demonstrado que vários genes celulares que possuem um papel potencial na regulação do ciclo celular podem ser ativados pela proteína *Tax*. Por isso a ativação de genes envolvidos no controle do ciclo celular é um dos prováveis mecanismos de oncogênese pelos retrovírus transindutores.

5.2 Pequenos vírus DNA tumorigênicos

Algumas famílias de vírus DNA possuem membros que têm sido associados com tumores, seja em infecções naturais ou após inoculação experimental. Alguns deles produzem tumores em animais e, por isso, possuem importância em medicina veterinária. Em particular, alguns vírus das famílias *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae* têm sido associados com tumores em seus hospedeiros naturais e têm comprovado o seu potencial oncogênico após inoculação em hospedeiros heterólogos. O primeiro vírus DNA tumorigênico identificado foi o CRPV (papilomavírus dos coelhos cauda-de-algodão) que causa papilomas cutâneos benignos nos hospedeiros naturais. Quando inoculado em coelhos domésticos, no entanto, o CRPV induz papilomas que tendem a progredir e se tornar carcinomas. Vários aspectos da tumorigênese associada com infecções virais foram estudados nesse modelo animal. O papilomavírus de camundongos também tem sido associado com tumores múltiplos, sobretudo após inoculação experimental em neonatos. O vírus

símio 40 (SV-40), também um membro da família *Polyomaviridae*, é capaz de produzir tumores em hamsters recém-nascidos. O SV-40 também tem sido associado com alguns tumores raros em pessoas que foram vacinadas há aproximadamente 50 anos com uma vacina antipoliomielite contaminada com o vírus. Os papilomavírus bovinos (BPVs) também têm sido associados com a indução de tumores nos seus hospedeiros. O BPV-1 está associado com papilomas e fibropapilomas, tumores cutâneos de caráter benigno e com frequência muito menor, a tumores cutâneos malignos. O BPV-4 está associado com a produção de carcinomas de laringe e esôfago em bovinos, cuja etiologia parece estar combinada com a intoxicação por samambaia. Os papilomavírus humanos 16 e 18 (HPV-16; HPV-18) estão envolvidos na produção de um dos tumores mais frequentes em humanos, o carcinoma de colo de útero de mulheres.

Os mecanismos pelos quais esses vírus induzem transformação neoplásica nas células hospedeiras têm sido intensivamente estudados nas últimas décadas. A capacidade oncogênica desses vírus tem sido atribuída a uma ou mais proteínas virais que se ligam e inativam proteínas celulares envolvidas na regulação do ciclo celular. Em particular, as proteínas celulares pRb e p53 são os alvos para o antígeno T, dos poliomavírus, e para as proteínas E6 e E7 dos papilomavírus. As proteínas da família da pRb e p53 exercem um papel regulatório-chave no controle da estabilidade do genoma, na proliferação, diferenciação e apoptose em células de mamíferos. A sua inativação pelas proteínas virais citadas resulta no descontrole do ciclo celular e eventualmente pode resultar em transformação neoplásica.

Os vírus da família *Hepadnaviridae*, também conhecidos como vírus das hepatites B, também têm sido associados com a produção de tumores em seus hospedeiros naturais. Além do vírus da hepatite B humana (HBV), os hepadnavírus de esquilos (GSHV) e de marmotas (WHV) estão associados com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, que ocorre ocasionalmente em hospedeiros com hepatite crônica. Os mecanismos responsáveis pela transformação neoplásica que ocorre nas infecções crônicas pelos hepadnavírus não estão completamente esclarecidos. Vá-

rios mecanismos têm sido propostos e acredita-se que a oncogênese pode resultar da combinação de mais de um deles. Os mecanismos propostos incluem: a) ativação de proto-oncogenes celulares pela inserção do genoma viral nos cromossomos; b) ativação de proto-oncogenes celulares pela proteína X; c) injúria e inflamação hepática crônica, com produção de substâncias potencialmente mutagênicas. Em geral, o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular é precedido por uma infecção hepática crônica de longa duração.

6 Imunopatologia em infecções víricas

O sistema imunológico é o responsável pela proteção do organismo contra agentes agressores, porém a ativação da resposta imune nem sempre é capaz de controlar a infecção. Além disso, em determinadas situações, a resposta produzida pode induzir lesões imunomediadas, determinando a ocorrência da doença. Várias doenças víricas, como a AIDS, a dengue, a anemia infecciosa equina e a artrite-encefalite caprina, entre outras, apresentam as lesões resultantes da resposta imunológica como componentes de sua patogenia.

A resposta imune em infecções víricas tem como objetivo a eliminação e/ou neutralização das partículas virais livres, pela ação de anticorpos e do complemento; além da destruição das células infectadas, pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), linfócitos T citotóxicos (CD8+) e lise por células *natural killer* (NK). Em algumas situações, essa resposta é suficiente para eliminar o vírus do organismo. No entanto, em outras situações, essa resposta pode causar injúria tecidual, doença e até matar o hospedeiro. Em alguns casos, é comum a coexistência do hospedeiro com o vírus, com a ocorrência de injúrias celulares e teciduais mínimas, muitas vezes sem o comprometimento da saúde geral do animal.

O grau de lesão que a resposta imunológica pode produzir no hospedeiro depende, em parte, dos órgãos envolvidos. Se a infecção ocorre no SNC ou no coração, as lesões são geralmente graves, enquanto uma resposta localizada na pele, por exemplo, possui consequências limitadas.

Os vírus podem induzir imunopatologias por diferentes mecanismos, como a indução de auto-imunidade, imunossupressão e pela deposição de imunocomplexos, que caracteriza a reação de hipersensibilidade do tipo III. As lesões imunomediadas ocorrem com maior frequência em infecções persistentes ou crônicas, e principalmente em infecções por vírus não-citolíticos.

6.1 Imunopatologia mediada por imunocomplexos

A consequência imunopatológica mais frequente em infecções víricas agudas ou persistentes é a formação de imunocomplexos. Esses complexos são formados por anticorpos ligados a partículas víricas ou a antígenos virais solúveis. Quando esses imunocomplexos são produzidos em excesso, podem resultar em imunopatologia. Isso ocorre quando os antígenos virais não são eliminados eficientemente ou quando a replicação do vírus não é controlada de forma eficiente pelo sistema imunológico. Dependendo do tipo de anticorpo e da sua capacidade neutralizante, os complexos podem carrear vírus viáveis que podem penetrar produtivamente em células que possuam receptores para anticorpos (receptores para a porção Fc), como macrófagos e linfócitos ativados. Lesões de glomerulonefrite imunomediada são frequentemente observadas em infecções víricas como a hepatite infecciosa canina, peritonite infecciosa felina, imunodeficiência felina, peste suína clássica, peste suína africana, entre outras.

Doenças mediadas por imunocomplexos somente ocorrem quando a sua produção excede a capacidade do organismo de removê-los dos tecidos e fluidos corporais. Em condições normais, os imunocomplexos produzidos são removidos através de fagocitose por macrófagos e células mesangiais antes que eles se depositem e causem algum tipo de lesão. Quando em excesso, a deposição dos imunocomplexos ocorre geralmente em locais com função de filtração de líquidos orgânicos, como os glomérulos renais, a parede dos vasos sanguíneos, as membranas sinoviais e o plexo coróide. As lesões causadas pela deposição dos imunocomplexos não são resultantes da

sua ação física e sim da ativação local do complemento e dos eventos inflamatórios resultantes dessa ativação.

A deposição de imunocomplexos na parede dos vasos e nos tecidos é seguida do aumento da permeabilidade vascular local, mediada por aminas vasoativas como a histamina e serotonina. A ligação da região Fc dos anticorpos dos imunocomplexos a receptores Fc das membranas provoca a liberação das aminas vasoativas provenientes de basófilos, plaquetas e mastócitos que circulam no local da deposição. A porção Fc se liga ao componente C1 e ativa a via clássica do complemento. Ocorre a atração de neutrófilos para o local de deposição, e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), o que contribui para a injúria local.

Os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas G estão presentes no plexo coróide, onde possuem distribuição periventricular. A localização desses receptores parece ter relevância na distribuição das lesões por deposição de imunocomplexos observadas na infecção pelo MVV e CAEV em pequenos ruminantes (ovinos e caprinos).

Na anemia infecciosa equina, os anticorpos se ligam a vírions livres no plasma, e os imunocomplexos são depositados principalmente nos glomérulos renais, levando à glomerulonefrite imunomediada. A circulação desses imunocomplexos também pode levar à hemólise, resultando em anemia.

O FeLV pode induzir deposição de imunocomplexos e imunodeficiência. Algumas vezes ocorrem altos níveis de antígenos virais e a formação e deposição de imunocomplexos leva à glomerulonefrite imunomediada. Em outros casos, ocorre depleção linfóide, em parte pela ADCC. Essa depleção leva a uma maior susceptibilidade a infecções secundárias, como estomatites crônicas, gengivites, lesões de pele e abscessos subcutâneos.

As lesões imunomediadas podem ocorrer também como seqüelas de infecções virais, sem envolvimento direto na patogenia da infecção, como a síndrome oftálmica que ocorre em cães convalescentes da infecção pelo CAdV-1. A lesão é caracterizada pela deposição de imunocomple-

xos na córnea, resultando em opacidade, conhecida como “olho azul”.

6.2 Imunopatologia mediada por linfócitos T citotóxicos

Os linfócitos T citotóxicos (CTLs, CD8+) possuem um papel relevante na erradicação de infecções víricas dos hospedeiros, pela sua capacidade de identificar e lisar células infectadas por vírus. Os CTLs reconhecem peptídeos virais conjugados com moléculas do MHC-I na superfície das células infectadas, através das moléculas TCR + CD8. Além de lisar células infectadas, os CTLs parecem ser capazes de erradicar certos vírus (p. ex.: vírus da hepatite B humana), sem a necessidade de lisar as células infectadas, provavelmente interferindo (através de citocinas) com alguma etapa da replicação viral. Dessa forma, a infecção aguda pelo HBV é geralmente erradicada por uma resposta vigorosa mediada principalmente por CTLs específicos para antígenos do vírus.

Por outro lado, a resposta imunológica de alguns pacientes não consegue erradicar a infecção e esses indivíduos se tornam portadores de infecção hepática crônica. Nesses indivíduos, a resposta mediada por CTLs é fraca ou indetectável, provavelmente devido a uma expansão clonal deficiente. Essa resposta fraca e contínua tem sido implicada na patogenia da infecção crônica, levando a lesões necro-inflamatórias crônicas no fígado, ou seja, a injúria celular de intensidade fraca, porém contínua, resultaria em um processo inflamatório persistente que resulta em hepatite crônica. Eventos semelhantes ocorrem em camundongos inoculados com o LCMV.

6.3 Imunopatologia por indução de auto-imunidade

A indução de auto-imunidade é outro mecanismo de imunopatologia que pode ocorrer em algumas infecções virais. Nesse mecanismo, pode ocorrer estimulação antigênica por determinantes antigênicos de proteínas virais que sejam semelhantes a proteínas do hospedeiro ou por distúrbios na ativação de linfócitos, que podem produ-

zir anticorpos contra proteínas próprias. Assim, os linfócitos T – que possuem papel essencial na resposta imune contra vírus – são responsáveis pela modulação da intensidade da resposta, limitando os danos causados por uma resposta agressiva. A expansão clonal dessas células em resposta a epitopos de proteínas do hospedeiro, evento que pode ocorrer em determinadas infecções víricas, está envolvido na indução de auto-imunidade. Esse processo ocorre, por exemplo, na encefalomielite murina de Theiler, em que a resposta específica de células T ao vírus ocorre junto com uma resposta imune contra a proteína básica da mielina, induzindo desmielinização auto-imune.

7 Imunossupressão por vírus

Grande parte das infecções víricas é acompanhada por disfunções no sistema imunológico, muitas das quais podem ser detectadas *in vivo* e demonstradas experimentalmente *in vitro*. Frequentemente, essas alterações ocorrem concomitantemente com uma resposta imunológica efetiva contra o vírus que as induziu. Por outro lado, alguns vírus suprimem a resposta imunológica contra os seus antígenos, proporcionando condições para o estabelecimento de infecções prolongadas ou persistentes. As alterações imunológicas causadas por infecções víricas podem aumentar a susceptibilidade do hospedeiro a infecções secundárias, dificultar ou retardar a resposta contra a própria infecção, ou levar a um desequilíbrio amplo e duradouro na resposta imunológica contra vários agentes. Falha em responder a outros antígenos, tanto por vacinação como infecção natural, resposta deficiente em provas de hipersensibilidade retardada e resposta proliferativa e citotóxica deficientes, têm sido associadas com diversas infecções víricas em humanos e animais. Ativação policlonal de linfócitos B, que pode resultar em um aumento inespecífico do nível de imunoglobulinas plasmáticas e dificultar o diagnóstico sorológico da infecção, além de reduzir a resposta a antígenos recém-introduzidos, também tem sido identificada em algumas infecções.

Os mecanismos envolvidos nesses eventos, no entanto, nem sempre são facilmente elucidáveis, sobretudo pela dificuldade de se mimetizar experimentalmente *in vitro* a complexidade das interações imunológicas que ocorrem *in vivo*. Em geral, os mecanismos envolvidos com imunossupressão por vírus podem ser devidos à replicação viral em células que participam da resposta imunológica, alteração da resposta imunológica normal pela resposta específica contra o vírus ou a efeitos indiretos da replicação e/ou de produtos virais. A Tabela 8.5 apresenta um resumo das alterações imunológicas já identificadas em infecções víricas e os mecanismos potencialmente envolvidos.

7.1 Replicação viral em células envolvidas na resposta imunológica

Diversos vírus replicam em células da linhagem mielóide e/ou linfóide, cujas células diferenciadas estão envolvidas com a resposta imunológica natural e adquirida. Para alguns vírus, essas células se constituem nos principais alvos da replicação, enquanto, para outros, elas representam apenas uma parcela das populações celulares infectadas. A infecção e destruição de células imunológicas é o mecanismo mais atraente e lógico na tentativa de explicar a imunossupressão causada por vírus. No entanto, este não é o úni-

Tabela 8.5. Principais alterações imunológicas e seus mecanismos de indução, por diferentes grupos de vírus

Família/ grupo	Alterações imunológicas			Mecanismos			
	Susceptibilidade a infecções	Proliferação linfóide reduzida	Aumento nas imunoglobu- linas	Replicação em células imunológicas	Ativação do sistema imune	Produtos de monócitos e linfócitos Th	Proteínas virais
Picornaviridae		+					
Flaviviridae						+	
Arteriviridae	+	+	+	+			
Coronaviridae	+	+		+			
Orthomyxoviridae	+		+			+	+
Paramyxoviridae	+	+		+	+		
Rhabdoviridae		+					
Arenaviridae	+	+		+	+	+	
Reoviridae	+					+	
Retroviridae	+	+	+	+	+	+	+
Parvoviridae		+	+	+			
Adenoviridae	+		+				+
Herpesviridae	+	+	+	+	+	+	+
Poxviridae	+	+					+

Fonte: adaptada de Griffin (1997).

co e talvez nem seja o mecanismo mais relevante envolvido na supressão da resposta imunológica por vírus.

Na verdade, na grande maioria das infecções víricas imunossupressivas estudadas, o percentual de células de determinada população que é infectada raramente atinge 1%. Essa pequena proporção infectada dificilmente seria suficiente para explicar a deficiência imunológica associada com essas infecções.

O HIV, por exemplo, infecta linfócitos TCD4+. Em células quiescentes, o vírus se encontra em um estado de latência, sem o genoma integrado nos cromossomos celulares. Por ocasião da ativação dessas células, que é seguida da integração do provírus DNA, a replicação viral é iniciada. A fração de linfócitos TCD4+ circulantes que é infectada situa-se em torno de 0,01 a 1%, sendo que menos de 10% destas produzem progênie viral. Essa proporção de células infectadas não justifica as severas alterações imunológicas observadas nos pacientes soropositivos, indicando a participação de outros mecanismos na imunossupressão.

Já o IBDV, um birnavírus de galinhas, infecta liticamente populações de linfócitos B que estão em divisão, resultando em imunossupressão profunda pela extensiva perda dessas células. Nos animais afetados, ocorre uma disfunção na resposta humoral, mediada por linfócitos B.

Dentre os vírus animais que infectam células do sistema imunológico se incluem: a) vírus que infectam linfócitos T: vários retrovírus animais (p. ex.: FeLV e FIV) e GHV-2 (vírus da doença de Marek); b) vírus que infectam linfócitos B: birnavírus (IPNV e IBDV), vírus da leucemia murina (MuLV), retrovírus símio, BVDV e BLV; c) vírus que infectam células da linhagem monocítica-macrofágica: VEEV, LCMV, vírus da influenza, vírus Maedi-Visna, CAEV, vírus da parainfluenza, vírus da peste suína africana (ASFV). ASFV, vários coronavírus, circovírus, arterivírus (PRRSV, EAV, LDEV), EIAV e ALV.

7.2 Imunossupressão associada com a ativação do sistema imune

Muitas alterações da resposta imunológica ocorrem no contexto da resposta desencadeada

contra o vírus infectante. Seriam, portanto, consequências inevitáveis da resposta necessária para combater este agente e montar uma resposta duradoura que proteja contra reinfecções. Nesse sentido, deficiências imunológicas podem ser resultantes de: a) ativação generalizada de linfócitos T sem os sinais apropriados (muitos dos quais morrem por apoptose); b) produção anormal (quantitativa e qualitativamente) de citocinas; c) depleção de linfócitos T vírus-específicos pela sua ativação em resposta ao agente. A participação desses mecanismos na imunossupressão é evidenciada pelo fato de que os níveis máximos de supressão coincidem com o aparecimento da resposta imunológica específica e erradicação do agente. Esse tipo de imunossupressão tem sido detectado em infecções pelo vírus da influenza, vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), entre outros.

7.3 Produtos de monócitos e linfócitos ativados

Várias interleucinas são produzidas por células especializadas em resposta a infecções víricas, incluindo os interferons do tipo I (IFN alfa e beta), IL-2 e receptor de IL-2, entre outras. A maioria dessas interleucinas atua modulando e estimulando a resposta celular e/ou humoral contra o agente infeccioso. No entanto, já foram identificados vários fatores produzidos por monócitos e linfócitos ativados que inibem a resposta imunológica. A resposta contra o vírus de Newcastle, por exemplo, é caracterizada pela redução da atividade dos linfócitos T citotóxicos contra um segundo vírus, associada com supressão dos níveis de IFN. As interleucinas 4 e 10 (IL-4, IL-10) produzidas por linfócitos ativados suprimem a função de monócitos/macrófagos.

7.4 Proteínas virais

Diversas proteínas codificadas por vírus interferem com a resposta imunológica do hospedeiro, retardando ou suprimindo esta resposta, permitindo, assim, a replicação e disseminação do vírus no hospedeiro (Tabela 8.6). Algumas dessas proteínas podem ser secretadas pelas células infectadas e interferir com a função de células

Tabela 8.6. Proteínas virais que interferem com a resposta imunológica do hospedeiro

Mecanismo efector	Vírus	Proteína viral	Proteína-alvo
Lise celular mediada por anticorpos e complemento	Vírus do herpes simplex	gE+gI gC	Porção Fc das Igs C3b
	Vírus vaccinia	VCP	C3b+C4b
Apresentação de antígenos pelo MHC-I a linfócitos citotóxicos	Adenovírus	E3/19K	Cadeia pesada MHC-I
	Vírus do herpes simplex	ICP47	TAP
	Citomegalovírus	UL-18	Beta 2-microglobulina
Produção de citocinas por macrófagos	Vírus do mixoma (Pox)	?	TNF
	Vírus vaccinia	?	TNF IL-1 beta
	Cowpox	? crmA	TNF IL-1 beta
Produção de citocinas por linfócitos Th	Orthopox	orfB8R	IFN gama
	Tanapox	38kDa	IFN gama, IL-2, IL-5
	Vírus do mixoma	37kDa	IFN gama

Fonte: adaptada de Griffin (1997).

não-infectadas. Já foi demonstrado, por exemplo, que a hemaglutinina do vírus da influenza afeta diretamente a função de neutrófilos. Outras proteínas virais podem se ligar a receptores de superfície celular e interferir com a sua função. Por exemplo, as glicoproteínas gE e gI do HSV (e provavelmente de outros alfa herpesvírus) se ligam na porção Fc das imunoglobulinas, impedindo que ocorra a ativação do complemento na superfície de células infectadas e prevenindo, assim, a destruição dessas células. Proteínas virais podem também atuar como superantígenos, ligando-se a receptores de linfócitos T e estimulando-os até a exaustão e depleção. A proteína E3/19 K dos adenovírus se liga com a cadeia pesada da molécula de MHC-I, retendo-a no retículo endoplasmático. Assim, as células infectadas pelos adenovírus não apresentam peptídeos virais associados com o MHC-I e não são reconhecidas pelos linfócitos Tc. Alguns poxvírus e herpesvírus também suprimem a expressão de MHC-I na superfície das

células infectadas. Os poxvírus codificam proteínas que são secretadas pelas células infectadas e interferem com a ação de interleucinas produzidas em resposta à infecção. Alguns desses vírus codificam uma proteína que se liga ao fator de necrose tumoral (TNF) e o impede de se ligar à superfície das células infectadas. O vírus do mixoma codifica uma proteína homóloga ao receptor do interferon gama (IFN γ). Os vírus da vaccinia e cowpox codificam proteínas que se ligam e inibem a função da IL-1, IFN- γ e TNF.

Em resumo, a infecção e alteração da função de células envolvidas na resposta imunológica não é o único mecanismo de imunossupressão causado por vírus. É provável que a imunossupressão observada nas infecções víricas, em sua maioria, deva-se à interação de múltiplos fatores, que incluem citocinas/interleucinas, infecção e disfunção de células imunológicas e efeitos de proteínas virais específicas.

8 Bibliografia consultada

- ADDIE, D.D. et al. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. **The Journal of General Virology**, v.84, p.2735-2744, 2003.
- AHMED, R.; MORRISON, L.A.; KNIPE, D. Persistence of viruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.8, p.219-249.
- AHMED, R.; MORRISON, L.A.; KNIPE, D. Viral persistence. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.9, p.181-205.
- BAKER, J.C. Clinical aspects of bovine virus diarrhea infection. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, p.25-41, 1990.
- BENEDICT, C.A.; NORRIS, P.S.; WARE, C.F. To kill or to be killed: viral evasion of apoptosis. **Nature Immunology**, v.3, p.1013-1018, 2002.
- BOLIN, S.R. The pathogenesis of mucosal disease. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.489-500, 1995.
- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhea virus infection. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, p.43-59, 1990.
- BROWN JR, T. et al. Immunopathology. In: SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. **Mechanism of Disease**. 3.ed. St. Louis, MO: Mosby, 2002. Cap.5, p.247-297.
- CHOW, L.T.; BROKER, T.R. Small DNA tumor viruses. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.12, p.267-301.
- CONNER, M.E.; RAMIG, R.F. Viral enteric diseases. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral Pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.30, p.713-743.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. **Archives of Virology**, v.149, p.857-874, 2004.
- DAWE, P.S. et al. Natural transmission of foot-and-mouth disease virus from African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in a wildlife area of Zimbabwe. **The Veterinary Record**, v.134, p.230-232, 1994.
- EVANS, A.S.; BRACHMAN, P.S. **Bacterial infections of humans: epidemiology and control**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1991. 908p.
- FLINT, S.J. et al. **Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. 804p.
- GAMOH, K. et al. The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.1027-1029, 2003.
- GASKELL, R.M.; BENNETT, M. Doenças infecciosas felinas. In: DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2001. p.953-978.
- GOCKE, D.J.; MORRIS, T.Q.; BRADLEY, S.E. Chronic hepatitis in a dog: the role of immune factors. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.156, p.1700-1705, 1970.
- GRIFFIN, D.E. Virus-induced immune suppression. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.10, p.207-233.
- HARDWICK, J.M.; GRIFFIN, D.E. Viral effects on cellular functions. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.4, p.55-83.
- HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of cell death program. **The Journal of General Virology**, v.83, p.1547-1564, 2002.
- HOLMES, K.V. Localization of viral infectious. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.3, p.35-53.
- HOSKINS, J.D. Canine viral enteritis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p.40-49.
- IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. Avian infectious bronchitis virus. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.19, p.493-508, 2000.
- JABRANE, A.; GIRARD, C.; ELAZHARY, Y. Pathogenicity of porcine respiratory coronavirus isolated in Quebec. **The Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.86-92, 1994.
- KNIPE, D.M. Virus-host cell interactions. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.10, p.273-299.
- LAPPIN, M.R. Viral diseases. In: LEIB, M.S.; MONROE, W.E. **Practical small animal internal medicine**. Philadelphia: Saunders, 1997. p.873-902.
- LIPTON, H.L.; GILDEN, D.H. Viral diseases of the nervous system: persistent infections. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.36, p.855-869.
- MIMS, C.A.; WHITE, D.O. **Viral pathogenesis and immunology**. Oxford: Blackwell Science Inc., 1984. 394p.
- MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.
- NATHANSON, N.; TYLER, K.L. Entry, dissemination, shedding, and transmission of viruses. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral**

pathogenesis. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. *Cap.2*, p.13-33.

PETERS, C.J. Viral hemorrhagic fevers. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. *Cap.32*, p.779-799 .

RIEDER, E.; WIMMER, E. Cellular receptors of picornaviruses: an overview. In: SEMLER, B.L.; WIMMER, E. (eds). **Molecular Biology of Picornaviruses**. Washington, DC: ASM Press, 2002. p.61-70.

SAIF, L.J.; WESLEY, R.D. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. In: STRAW, B.E. et al. **Diseases of Swine**. Ames, IA: Iowa State University, 1999. *Cap.24*, p.295-325.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. Veterinary neuropathology. In: _____. **Immunobiology and immunopathology of the central nervous system**. St. Louis, MO: Mosby, 1995. p.23-26.

THOMSON, B.J. Viruses and apoptosis. **International Journal of Experimental Pathology**, v.82, p.65-76, 2001.

TYLER, K.L.; FIELDS, B.N. Pathogenesis of viral infections. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. *Cap.7*, p.173-218.

TYLER, K.L.; GONZALEZ-SCARANO, F. Viral diseases of the nervous system: acute infectious. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. *Cap.35*, p.837-853.

WEAVER, S.C. et al. Venezuelan equine encephalitis. **Annual Review of Entomology**, v.49, p.141-174, 2004.

WHITMORE, H.L.; ZEMJANIS, R.; OLSON, J. Effects of bovine viral diarrhea virus on conception in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.178, p.1065-1067, 1981.

WIMMER, E. **Cellular receptors for animal viruses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1994. 526p.

WRIGHT, P.F. Respiratory diseases. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. *Cap.29*, p.703-711.

ZINKERNAGEL, R.M. Virus-induced immunopathology. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. *Cap.8*, p.163-179.

RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA VÍRUS

Luiz Carlos Kreutz

9

1 Introdução	239
2 Resposta imune inata	239
2.1 Interferon tipo I	240
2.2 Sistema complemento	242
2.3 Células <i>natural killer</i>	242
2.4 Células dendríticas	243
2.4.1 Interação entre as DCs e células NK	243
2.4.2 O papel das DCs na resposta imune adquirida	243
3 Resposta imune adquirida	244
3.1 Reconhecimento de antígenos pelo sistema imunológico	244
3.1.1 Reconhecimento de antígenos pelos linfócitos B	244
3.1.2 Reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T	245
3.2 Resposta imune celular	249
3.2.1 Importância dos linfócitos Tc na imunidade antiviral	250
3.3 Resposta imune humoral	250
3.4 Respostas primária e secundária/memória imunológica	252
3.5 As imunoglobulinas na defesa antiviral	253
3.5.1 Mecanismos de ação das imunoglobulinas	254
3.6 O papel da resposta humoral e celular na imunidade antiviral	255
4 Mecanismos virais de evasão da resposta imune	256
4.1 Infecções latentes no sistema nervoso central	256
4.2 Variações antigênicas	256
4.3 Indução de tolerância	257
4.4 Integração do material genético viral no genoma do hospedeiro	257
4.5 Infecção de sítios imunologicamente privilegiados	257
4.6 Interferência com funções do sistema imunológico	258

5 Considerações finais	258
6 Bibliografia consultada	258

1 Introdução

A imunidade ou resistência do hospedeiro contra infecções víricas depende da atuação integrada da resposta imune inata e da resposta imune adquirida. Os mecanismos envolvidos na *resposta imune inata* atuam imediatamente após o contato do hospedeiro com os antígenos virais, não possuem capacidade de discriminação entre os vírus e não necessitam de exposição prévia para serem desencadeados. Os mecanismos envolvidos na *resposta imune adquirida*, por sua vez, desenvolvem-se seqüencialmente e de forma mais lenta e sincronizada, resultando na indução de células efetoras, que irão combater o agente, e de células de memória, que possuem vida longa e que serão efetivamente reestimuladas em exposições posteriores ao mesmo agente.

A divisão entre a resposta imune inata e adquirida não é absoluta, e essas duas formas de resposta estão interligadas, atuando conjuntamente no combate aos agentes agressores. Os principais protagonistas da conexão entre essas respostas são as células dendríticas (*dendritic cells*, DCs). Essas células circulam pelos tecidos periféricos, onde capturam antígenos, e se dirigem aos órgãos linfóides secundários, onde estimulam as células linfóides. Além disso, as infecções víricas são acompanhadas de estímulos químicos e celulares que formam uma intrincada rede de informações, que visam maximizar o mecanismo imunológico mais efetivo contra a maioria dos vírus: os linfócitos T citotóxicos (Tc).

Os componentes da imunidade inata são ativados precocemente após a infecção e se encarregam de limitar e restringir a replicação viral até que os mecanismos da resposta imune adquirida tenham sido desencadeados. Na resposta inata contra vírus, atuam principalmente o interferon do tipo I (IFN-I), células *natural killer* (NK) e os componentes ativos do complemento. A resposta imune adquirida é mediada por células (linfócitos T) e por moléculas circulantes (anticorpos), produzidas por células derivadas dos linfócitos B. As citocinas (ou interleucinas [ILs]) são peptídeos produzidos por uma variedade de células que moderam e influenciam a função de outras células do sistema imunológico.

2 Resposta imune inata

A resposta imune inata (também denominada *natural* ou *inespecífica*) é mediada por células e moléculas. Previamente à estimulação dessa resposta, mecanismos naturais de proteção contra a penetração de patógenos, como a pele, os pêlos, o muco, enzimas, peptídeos antivirais e anti-bacterianos representam as barreiras iniciais contra os agentes infecciosos. A ausência ou disfunção desses mecanismos provavelmente resultaria em um aumento da frequência e da severidade das infecções. Embora sejam considerados componentes da imunidade inata, essas barreiras não serão abordadas nessa revisão. Aqui, será dado enfoque aos mecanismos imunológicos naturais que efetivamente participam da imunidade antiviral e, principalmente, que cooperam com a ativação da resposta imune específica.

A resposta imune inata é assim denominada em razão de algumas características peculiares, tais como: a) atua imediatamente após o contato com o agente; b) não discrimina diferentes tipos de antígenos; c) atua com intensidade relativamente constante e d) não possui memória. É questionável se, agindo isoladamente, a resposta inata seria capaz de erradicar uma infecção víri-

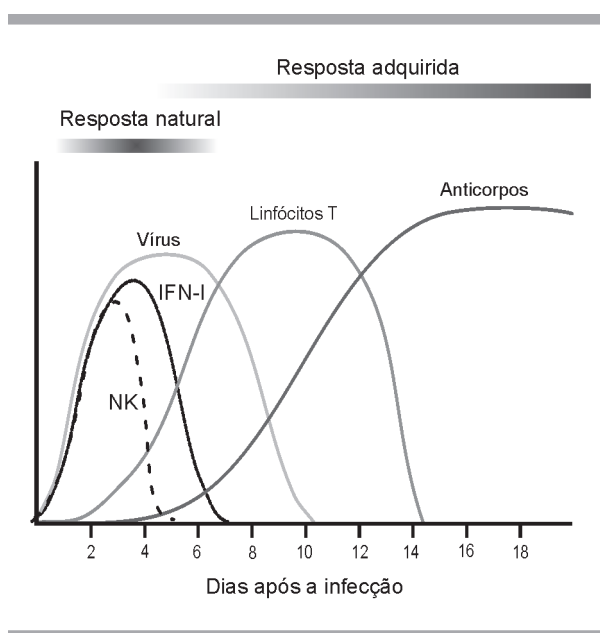


Figura 9.1. Seqüência de eventos imunológicos que ocorrem durante as infecções víricas.

ca estabelecida. No entanto, os seus mecanismos efetores se constituem em obstáculos importantes, que retardam a progressão do processo infeccioso, controlando-o temporariamente e, assim, permitindo o desenvolvimento da imunidade específica. Os principais componentes da resposta inata contra vírus são representados pelo IFN-I, sistema complemento, células NK e DCs. Esses mecanismos são desencadeados seqüencialmente após a infecção vírica e antecedem o desenvolvimento dos mecanismos específicos (Figura 9.1).

2.1 Interferon

O primeiro obstáculo à infecção viral é representado pelos IFN-I, que foram justamente identificados pela sua capacidade de interferir com a replicação viral. O IFN-I compreende dois tipos principais: interferon alfa (IFN- α) e interferon beta (IFN- β), que são produzidos por vários tipos de células em resposta às infecções víricas. Vários vírus são potentes indutores de IFN-I, e a sua indução está associada com a produção de RNA de fita dupla no interior da célula durante a replicação viral. A interação de alguns vírus com

os receptores celulares também parece estimular a produção de IFN-I. Qualquer célula nucleada é capaz de produzir IFN-I em resposta a uma infecção por vírus, mas evidências recentes indicam que as DCs plasmacitóides (pDCs) representam a principal fonte dessa citocina.

O IFN-I produzido por células infectadas é secretado no meio extracelular e se distribui localmente, interagindo com as células vizinhas e induzindo um estado de resistência antiviral (Figura 9.2). Essa interação é mediada por receptores específicos na superfície celular, que estão amplamente distribuídos nos tecidos. A ligação do IFN-I aos receptores desencadeia uma série de sinais intracelulares que induzem a transcrição de genes cujos produtos estão envolvidos na resposta mediada pelos IFNs. Os principais efeitos antivirais do IFN-I são devidos à degradação de RNAs mensageiros (mRNA) e inibição da tradução. Dessa forma, esta citocina inibe a síntese de proteínas na célula-alvo, tornando-a um meio impróprio para a replicação viral, uma vez que os vírus dependem integralmente da maquinaria celular de síntese protéica para a sua replicação.

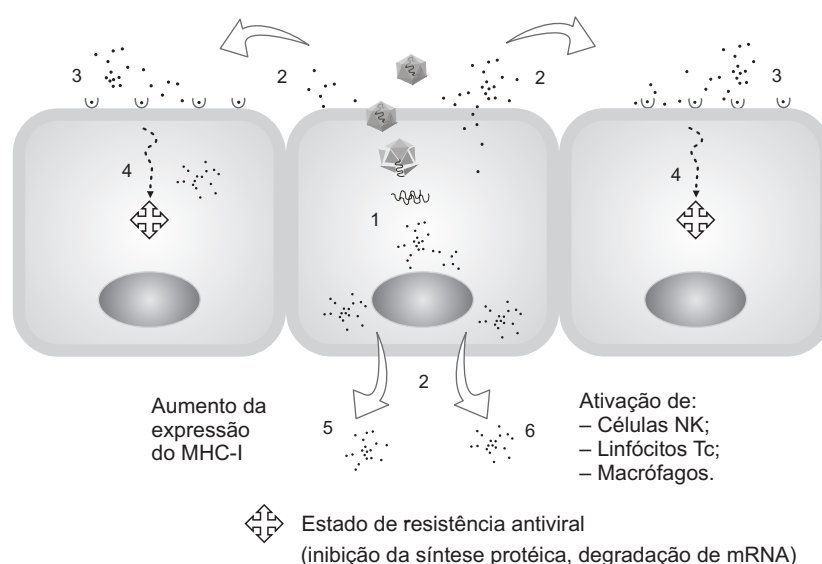


Figura 9.2. Indução e principais funções do IFN-I na resposta imune inata. A presença de RNA de fita dupla em células infectadas por vírus induz a produção de IFN-I (1), que é secretado no meio extracelular (2). O IFN-I interage com receptores nas células vizinhas (3) e desencadeia uma série de reações que resultam na indução de um estado de resistência antiviral (4). O IFN-I também promove um aumento na expressão do MHC-I (5), além de ativar células NK, linfócitos Tc e macrófagos (6).

O IFN-I desencadeia uma série de reações intracelulares que levam à expressão da enzima 2'-5'-adenilato sintetase. Essa enzima sintetiza oligômeros de adenina (oligo-A), que, por sua vez, ativam a endorribonuclease RNase L. A ativação da RNase L resulta na degradação de mRNA celulares e virais. Além disso, o IFN-I promove a ativação da enzima proteína quinase R (PKR), que fosforila e inativa o fator de iniciação da tradução (*elongation initiation factor 2* - eIF-2). Com isso, a tradução de mRNAs celulares e virais também fica inibida. Outro grupo de IFN-I induz um estado antiviral pela indução das proteínas Mx, que também contribuem para a inibição da síntese protéica celular.

O IFN-I atua também como fator de sobrevivência para as pDCs, promove o desenvolvimento, maturação e atividade microbicida dos macrófagos e ativa as células NK, que, por sua vez, interagem sinergisticamente com as DCs.

Além de seu papel na imunidade inata, o IFN-I possui um papel importante no desenvolvimento da imunidade específica, por meio de diferentes mecanismos, tais como: a) indução da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal do tipo I (MHC-I), o que favorece o processamento e a apresentação de antígenos endógenos; b) ativação das DCs, produzindo um aumento da expressão de receptores e produção de citocinas; c) estimulação da

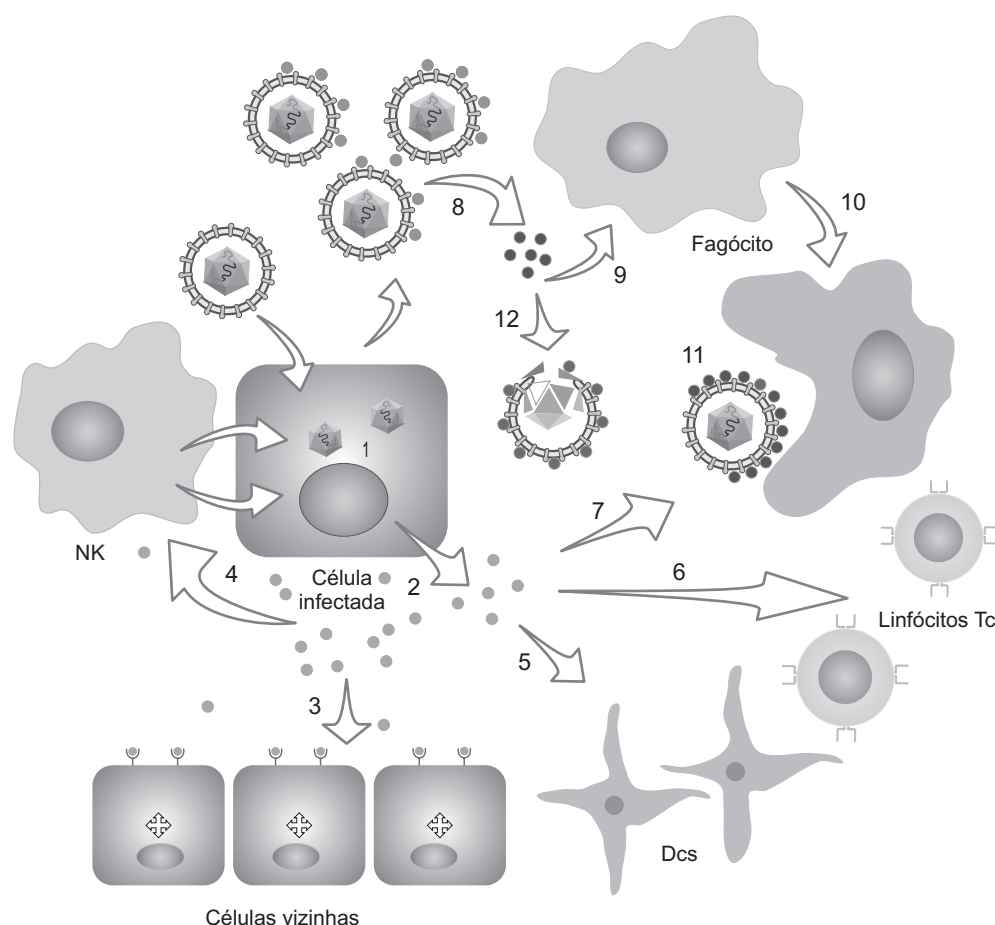


Figura 9.3. Mecanismos efetores associados com a resposta imune inata. A infecção viral (1) resulta na produção e secreção de IFN-I pelas células infectadas (2). O IFN-I secretado induz um estado de resistência antiviral nas células vizinhas (3); ativa células NK (4), DCs (5), linfócitos Tc (6) e estimula a atividade fagocítica dos macrófagos (7). Simultaneamente, a presença de vírions pode levar à ativação do complemento (8); cujos componentes ativados atraem e ativam fagócitos (9, 10), opsonizam vírions, facilitando a fagocitose (11) ou promovem a lise de vírus envelopados (12).

sobrevivência e proliferação de linfócitos T de memória; d) estimulação da produção de interferon gama (IFN- γ) pelas DCs e linfócitos T; e) participação direta e indireta na diferenciação e atividade dos linfócitos B. Os mecanismos de ativação e as atividades desempenhadas pelo IFN-I na resposta imune à infecções víricas estão ilustrados nas Figura 9.2 e 9.3.

2.2 Sistema complemento

O sistema complemento é composto por um conjunto de proteínas presentes no plasma sanguíneo na forma inativa. Essas proteínas podem ser ativadas pela presença de complexos imunes, formados pela ligação de imunoglobulinas com antígenos (via clássica de ativação), pela deposição espontânea do componente C3b do complemento na superfície de microorganismos (via alternativa) ou devido à ligação com proteínas que se ligam à manose (via da lecitina). A ativação do complemento por qualquer uma dessas vias resulta em uma cascata de ativação sequencial, com a formação de moléculas intermediárias que possuem diversas atividades biológicas, principalmente ligadas à ativação do processo inflamatório. Dentre as funções dos componentes ativados do complemento destacam-se: opsonização; quimiotaxia e ativação de neutrófilos e outras células inflamatórias; degranulação de mastócitos com conseqüente vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar e formação do complexo de ataque à membrana (*membrane attack complex*, MAC), formado pela associação dos componentes C5-9 e que se inserem na membrana de células infectadas ou no envelope de vírions, resultando na sua destruição.

O componente mais importante do complemento é denominado C3, que, a partir da ativação da cascata, é clivado de forma contínua e espontânea, gerando os produtos C3a e C3b. Uma vez produzido, o C3b se deposita em superfícies que não possuam ácido siálico, como o envelope de diversos vírus, e, assim, desencadeia a cascata de ativação do complemento, que culmina com a formação do MAC e com a destruição do vírion. A presença de ácido siálico na superfície das células animais (e eventualmente em algumas bactérias

e fungos) torna-as resistentes ao complemento, pois inibe a ligação de alguns componentes que dão continuidade à cascata e posterior formação do MAC.

2.3 Células *natural killer*

As células *natural killer* (NK) são derivadas de progenitores linfóides da medula óssea e foram assim denominadas em razão de sua capacidade de destruir células tumorais e células infectadas por vírus na ausência de um reconhecimento antígeno-específico. Constituem o que se convencionou chamar de *terceira população de linfócitos* (linfócitos B, T e células NK). Por não possuírem marcadores específicos de linfócitos B ou de linfócitos T, foram inicialmente chamadas de *células nulas* (*null cells*). As células NK estão presentes principalmente nos tecidos linfóides periféricos e atuam direta, pela capacidade de destruir células infectadas, e indiretamente mediante a secreção de citocinas. A atividade das células NK precede a ativação da resposta imune específica. A destruição de células infectadas por vírus é realizada inicialmente pelas células NK e, posteriormente, pelos linfócitos Tc.

A capacidade das células NK em distinguir células infectadas de células não-infectadas está relacionada com a presença de receptores inibidores da destruição (*killing inhibitory receptors = KIR*) na sua superfície. Esses receptores reconhecem as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal do tipo I (MHC-I), que estão presentes na superfície de virtualmente todas as células do organismo. A expressão do MHC-I está geralmente reduzida em células infectadas por vírus e em células tumorais. Dessa forma, utilizando os receptores KIR, as células NK podem detectar se uma célula está expressando moléculas do MHC-I em níveis normais. A ligação dos KIR em moléculas do MHC-I inibe a ação das células NK. No caso da expressão das moléculas de MHC-I estar reduzida, essa célula torna-se alvo de destruição pelas células NK.

O mecanismo utilizado pelas células NK para destruir as células-alvo é semelhante ao utilizado pelos linfócitos Tc. O contato com a célula infectada estimula as NK a liberarem perforinas

no meio extracelular. As perforinas são proteínas semelhantes aos componentes C5-C9 do complemento e produzem pequenos poros na membrana plasmática da célula-alvo. As células NK liberam então as granzimas, que penetram por estes poros e induzem morte celular por apoptose.

Durante a resposta inata, as células NK destroem células infectadas independentemente do reconhecimento de antígenos específicos. No curso da resposta imune específica e após a produção de anticorpos antivirais, as células NK também podem participar da destruição de células infectadas. Nesse caso, anticorpos produzidos contra antígenos virais se ligam em antígenos virais presentes na superfície das células infectadas. Essa ligação facilita o seu reconhecimento pelas células NK, pois estas possuem receptores para a porção Fc das imunoglobulinas. Essa atividade é denominada citotoxicidade celular dependente de anticorpos (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) e também pode ser mediada por outras células que possuem receptores para a porção Fc (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos).

Além de destruir células infectadas por vírus, as células NK contribuem para a defesa antiviral pela secreção de várias citocinas, incluindo o IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essas células também possuem receptores para várias citocinas (IL-2, IL-12 e TNF- α) que podem influenciar na sua atividade.

2.4 Células dendríticas

As células dendríticas (DCs) constituem uma população heterogênea de células que diferem entre si em relação à origem, fenótipo, localização, função e necessidades para o desenvolvimento. As DCs que se originam de progenitores mielóides da medula óssea são semelhantes aos monócitos e são denominadas de *DCs mielóides* (mDCs). Por outro lado, as DCs que se originam dos progenitores linfóides são denominadas de *DCs plasmacitóides* (pDCs) e se assemelham aos plasmócitos. As mDCs são encontradas em quase todos os tecidos e órgãos, com exceção do cérebro, dos olhos e dos testículos. São especialmente abundantes nos linfonodos, na pele e em tecidos subjacentes a superfícies mucosas, locais

freqüentes de penetração de agentes virais. As células de Langerhans (LC), por exemplo, estão localizadas na epiderme; DCs intersticiais estão localizadas na derme, nas mucosas e em tecidos periféricos. Por outro lado, as pDCs encontram-se principalmente nos órgãos linfóides, como a medula óssea, timo, baço, tonsilas e linfonodos. As mDCs desempenham a importante função de apresentar antígenos aos linfócitos T e transferir antígenos aos linfócitos B, eventos que se constituem no principal elo entre a imunidade inata e a imunidade adquirida. Além disso, as pDCs são as principais células produtoras de IFN-I durante as infecções virais e participam ativamente da estimulação das células NK.

2.4.1 Interação entre as DCs e células NK

As DCs estimulam as células NK por meio de mediadores solúveis e também por contato direto. A interação entre as DCs e as células NK é importante para a ativação das próprias DCs. A ativação das DCs pelas células NK depende de contato direto, da proporção NK:DCs e de citocinas como o TNF- α . Células NK pré-ativadas por IL-2 são potentes estimuladoras das DCs, agindo tanto de forma isolada como em sinergismo com estímulos inflamatórios, como os lipopolissacarídeos (LPS). A interação entre as células NK e DCs parece ocorrer nos locais da infecção, onde existem DCs imaturas residentes e para onde migram as células NK em resposta a estímulos inflamatórios. Essa interação pode ocorrer também nos linfonodos e em outros órgãos linfóides secundários, para onde as DCs migram após capturar antígenos nos tecidos periféricos.

2.4.2 O papel das DCs na resposta imune adquirida

As DCs constituem o principal elo entre a imunidade inata e a imunidade adquirida. As DCs são especializadas na captura e apresentação de antígenos aos linfócitos T, evento essencial para a estimulação dessas células em resposta a antígenos. Por sua vez, a estimulação de linfócitos Th resulta na produção de citocinas que ativam tanto a resposta mediada por células (Tc) como a resposta humoral (linfócitos B – plasmócitos). Os

estímulos para a proliferação dessas células são fornecidos por mediadores solúveis (citocinas ou interleucinas) produzidos pelas próprias DCs, ou no microambiente dos linfonodos, onde os linfócitos são ativados.

As DCs encontram-se nos principais locais de penetração dos vírus e também nos linfonodos e em outros tecidos linfóides secundários. Consequentemente, o contato dos vírus ou de suas proteínas com as DCs é praticamente inevitável e é fundamental para que as DCs processem adequadamente os antígenos virais e os apresentem às diferentes populações de linfócitos.

Os mecanismos envolvidos na resposta imune inata contra vírus estão ilustrados na Figura 9.3.

3 Resposta imune adquirida

Os mecanismos imunológicos específicos contra as infecções víricas são desencadeados após a estimulação direta ou indireta dos linfócitos T e B pelos antígenos virais e possuem como características principais: *especificidade* (cada célula reconhece apenas um determinante antigênico); *diversidade* (capacidade de reconhecer uma grande variedade de antígenos) e *memória imunológica* (capacidade de produzir uma resposta qualitativa e quantitativamente diferente em exposições subsequentes a um determinado antígeno). Além disso, a resposta imune específica se caracteriza pela tolerância a antígenos do próprio organismo.

De acordo com os mecanismos efetores, a resposta imune específica pode ser dividida em *celular* e *humoral*. A resposta celular é mediada pelos linfócitos T auxiliares (T *helper* ou Th) e linfócitos Tc. A resposta humoral é mediada pelos anticorpos produzidos pelos plasmócitos, células derivadas dos linfócitos B. Embora sejam tratados separadamente com fins didáticos, os mecanismos envolvidos nessas duas respostas são complementares e atuam conjuntamente no combate às infecções víricas. A importância relativa desses mecanismos, no entanto, varia entre os diferentes vírus, de acordo com a sua biologia. Para alguns vírus, a resposta mediada por linfóci-

tos Tc é fundamental na erradicação da infecção; para outros, a resposta humoral desempenha um papel mais importante na proteção. O conhecimento dos mecanismos específicos envolvidos na resposta imunológica contra cada vírus é fundamental para a elaboração de vacinas.

A etapa inicial da resposta imunológica específica é o reconhecimento de antígenos pelos linfócitos Th, Tc e B. Em resposta ao contato com o antígeno, os linfócitos Th secretam várias citocinas, que estimulam a atividade de outras células envolvidas na resposta imunológica. Os linfócitos Tc reconhecem e destroem células infectadas por vírus e também secretam algumas citocinas. Estimulados pelo contato com o antígeno, os linfócitos B proliferam e se diferenciam em plasmócitos. Os anticorpos, produzidos pelos plasmócitos são proteínas solúveis que possuem diversas funções no combate aos agentes invasores.

3.1 Reconhecimento de antígenos pelo sistema imunológico

A capacidade de distinguir antígenos *próprios* de antígenos *não-próprios* (neste caso, os antígenos virais) se constitui no evento central da resposta imune adquirida. Antígenos não-próprios devem ser reconhecidos como tal, e o seu reconhecimento deve induzir uma resposta que resulte na sua eliminação e/ou inativação. Por outro lado, os antígenos próprios devem ser igualmente reconhecidos, porém devem ser tolerados. Ou seja, antígenos do próprio organismo não devem estimular uma resposta imunológica. A resposta imunológica específica contra vírus é mediada por diferentes subpopulações de linfócitos: os linfócitos Th, Tc e B. Essas três populações de linfócitos apresentam mecanismos efetores distintos e reconhecem os antígenos de formas diferentes. A seguir serão apresentados os mecanismos de reconhecimento de antígenos pelos linfócitos B e T.

3.1.1 Reconhecimento de antígenos pelos linfócitos B

Os linfócitos B reconhecem os antígenos virais através de receptores de membrana denomi-

nados BCRs (*B cell receptors*). Os BCRs são moléculas de imunoglobulinas das classes IgD e IgM, que possuem uma região altamente variável, capaz de se ligar a uma variedade muito grande de determinantes antigênicos. Os BCRs podem se ligar a antígenos de qualquer natureza química, sejam proteínas, carboidratos, lipídios ou outras macromoléculas, ou seja, os linfócitos B podem reconhecer e responder a antígenos protéicos e não-protéicos, desde que esses possuam regiões complementares às regiões variáveis dos seus BCRs. Isso faz com que os linfócitos B reconheçam antígenos na sua forma nativa, solúvel ou não, sem a necessidade de processamento prévio. No caso dos vírus, os principais antígenos reconhecidos pelos linfócitos B são as proteínas de superfície dos vírions, devido a sua localização e acessibilidade aos BCRs. Proteínas virais inseridas em membranas celulares, além de proteínas secretadas pelas células infectadas, também podem estimular os linfócitos B. Os linfócitos B também podem reconhecer antígenos virais capturados e armazenados na superfície das DCs, sob a forma de pequenas esferas (icossomos). Do ponto de vista de proteção, os anticorpos induzidos contra proteínas de superfície (do capsídeo ou envelope) possuem importância especial, pois podem se ligar e neutralizar a infectividade dos vírus.

Os locais de contato entre os antígenos e os linfócitos B – locais de reconhecimento do antígeno – são principalmente os órgãos linfóides periféricos, dentre estes, os linfonodos.

3.1.2 Reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T

O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T é mais complexo e requer que o antígeno seja previamente processado e apresentado por células e moléculas especializadas. Os linfócitos T não são capazes de responder a antígenos em sua forma nativa, solúvel ou não, e somente são estimulados por antígenos protéicos, ou seja, apenas as proteínas virais estimulam a resposta celular. Dependendo da sua origem e da forma como são processadas, as proteínas virais podem ser reconhecidas pelos linfócitos Th, pelos Tc ou

por ambos. A forma de reconhecimento de antígenos por esses dois tipos de linfócitos, no entanto, é diferente:

3.1.2.1 Reconhecimento de antígeno pelos linfócitos Th

Os linfócitos Th reconhecem antígenos virais através de seus receptores de membrana, denominados TCRs (*T cell receptors*), juntamente com a molécula acessória CD4. Por isso, são também chamados de linfócitos T CD4+. Para que um antígeno protéico seja reconhecido pelo complexo TCR+CD4 e estimule o linfócito Th, ele deve ser previamente processado e apresentado de forma adequada por células especializadas. O processamento do antígeno protéico envolve a sua internalização por endocitose ou fagocitose, clivagem enzimática em peptídeos de 12 a 16 aminoácidos e conjugação dos peptídeos com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHC-II). Esses processos ocorrem em compartimentos citoplasmáticos especializados (endossomos, fagossomos e retículo endoplasmático). Os complexos MHC-II + peptídeo são, então, transportados até a superfície celular, onde ficam expostos à espera do reconhecimento pelos linfócitos Th. O reconhecimento dos complexos MHC-II + peptídeos é realizado pelos receptores TCR+CD4 existentes na membrana dos linfócitos Th e resulta na ativação desses linfócitos. Essa via de apresentação é denominada *exógena*, pois ocorre com proteínas extracelulares que são previamente internalizadas e processadas. Proteínas estruturais dos vírions, proteínas virais secretadas pelas células infectadas ou extravasadas no meio extracelular após a lise celular podem ser processadas desta maneira e ser apresentadas aos linfócitos Th. Em resumo, os linfócitos Th reconhecem antígenos virais protéicos, desde que devidamente processados e apresentados em associação com moléculas do MHC-II por células especializadas (Figura 9.4).

Embora um número grande de células do organismo seja capaz de capturar proteínas e outras macromoléculas no meio externo e processá-las, somente um grupo restrito de células expressa moléculas do MHC-II. Dentre estas, incluem-se

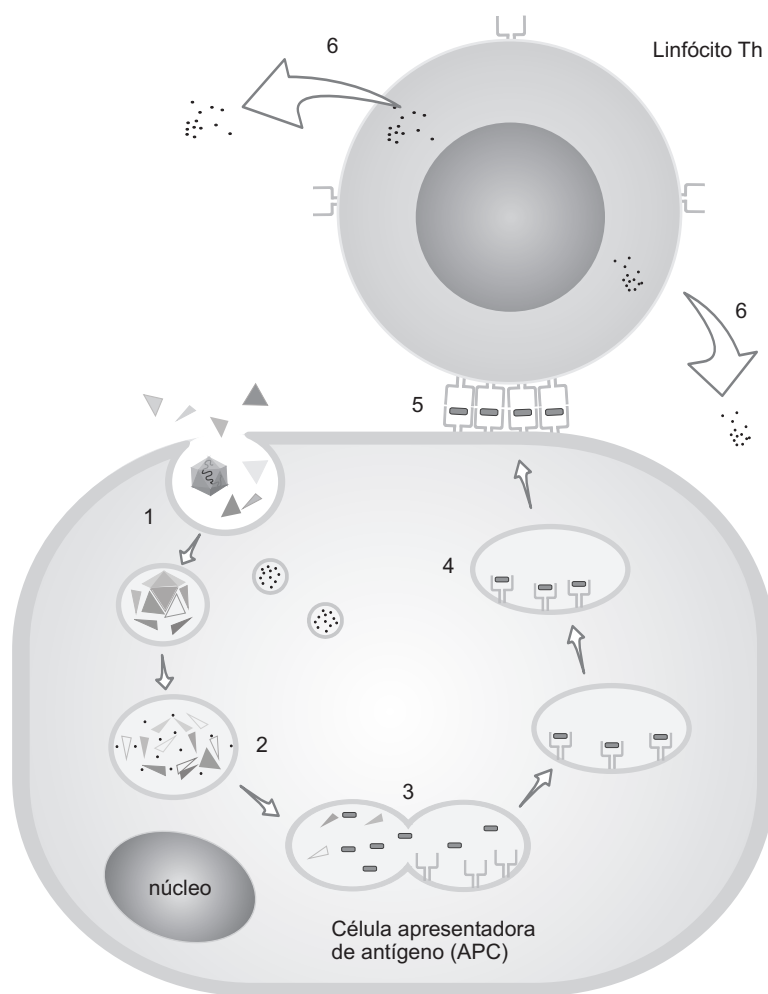


Figura 9.4. Apresentação de antígenos virais extracelulares e resposta por linfócitos Th. Antígenos virais extracelulares são internalizados por endocitose e/ou fagocitose (1) e processados proteoliticamente no interior de vesículas (2), gerando peptídeos que são conjugados com moléculas do MHC-II no retículo endoplasmático (3). Os complexos peptídeo-MHC-II são transportados até a superfície celular (4), onde são reconhecidos pelos linfócitos Th (5). Os linfócitos Th, estimulados por esse contato, secretam interleucinas (6) que possuem diversas ações modulatórias sobre as células envolvidas na resposta imunológica.

as células da linhagem monocítica/macrofágica (monócitos, macrófagos, CDs, células interdigitantes e LC), algumas células endoteliais e os linfócitos B. Ou seja, somente essas células são capazes de apresentar antígenos virais presentes no meio extracelular (exógenos) aos linfócitos Th. As células que possuem como função precípua a captura, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos Th são denominadas genericamente células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais e, dentre estas, destacam-se as DCs e os macrófagos. Embora não se constituam em APCs profissionais, os linfócitos B também apresentam antígenos virais de forma eficiente aos linfócitos Th. A via exógena de apresentação de antígenos

aos linfócitos Th está representada esquematicamente na Figura 9.4.

3.1.2.2 Reconhecimento de antígeno pelos linfócitos Tc

Os linfócitos Tc reconhecem proteínas virais através dos TCRs, juntamente com a molécula acessória CD8. Por isso, essas células também são chamadas de linfócitos T CD8+. Para que as proteínas virais sejam reconhecidas pelos receptores TCR+CD8 e estimulem os linfócitos Tc, também devem ser adequadamente processadas e apresentadas. No entanto, essa forma de processamento e apresentação somente ocorre com as

proteínas sintetizadas no interior das células durante a infecção, e não com proteínas extracelulares que são internalizadas. Por isso, essa via de apresentação é denominada *endógena*. Proteínas virais produzidas no interior das células durante o ciclo replicativo são clivadas enzimaticamente em peptídeos de 8 a 12 aminoácidos, que são conjugados com moléculas do MHC-I. Os complexos MHC-I+peptídeos virais são transportados até a superfície celular, onde ficam expostos (Figura 9.5). Esse é um processo fisiológico e resulta também na apresentação de fragmentos de proteínas celulares. No entanto, apenas os peptídeos resultantes da clivagem das proteínas virais são capazes de estimular os linfócitos Tc. O reconhe-

cimento dos complexos MHC-I+peptídeo é realizado pelos complexos TCR+CD8 existentes na membrana dos linfócitos Tc. Essa interação gera estímulos que, em conjunto com citocinas produzidas pelos Th e DCs, levam à ativação dos linfócitos Tc. Resumindo, os linfócitos Tc reconhecem proteínas virais endógenas, após o seu processamento e conjugação com moléculas do MHC-I. Como, virtualmente, todas as células do organismo – com exceção dos neurônios – expressam o MHC-I, a infecção de quaisquer dessas células por vírus irá resultar no reconhecimento e resposta mediada por linfócitos Tc. Acredita-se, no entanto, que as DCs sejam mais efetivas na indução dos linfócitos Tc, pois, além da apresentação

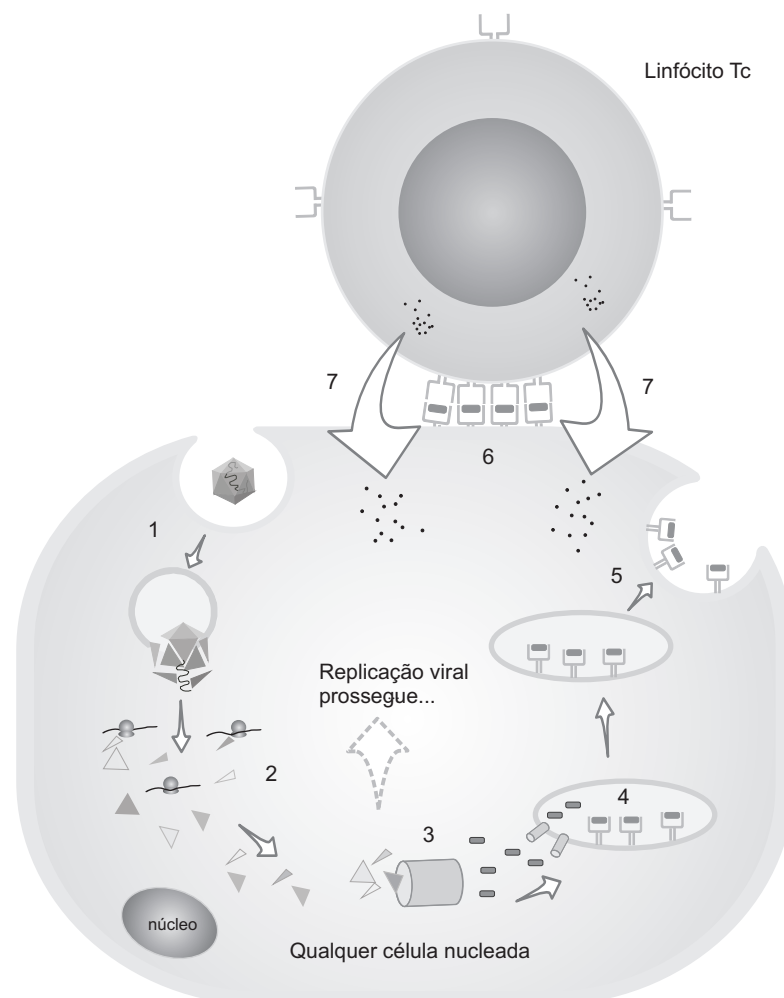


Figura 9.5. Apresentação de antígenos virais endógenos e resposta por linfócitos Tc. Após a penetração do vírus (1), as proteínas virais são produzidas pelo aparato celular de tradução (2). Parte dessas proteínas são processadas pelos proteassomos (3), resultando em peptídeos que são conjugados com moléculas do MHC-I no RE (4). Esses complexos são transportados até a superfície celular (5), onde serão reconhecidos pelos linfócitos Tc (6). Ativados pelo contato com o antígeno e por citocinas, os linfócitos Tc liberam o conteúdo citotóxico de seus grânulos (7), destruindo a célula infectada.

do MHC-I+ peptídeos, são capazes de fornecer os sinais adicionais para a ativação integral dos Tc. Essa via de apresentação e reconhecimento de antígenos é muito importante na resposta a infecções víricas, pois permite ao sistema imunológico reconhecer células infectadas por vírus e ativar o mecanismo mais efetivo para a sua destruição, os linfócitos Tc. Tanto as proteínas estruturais como as não-estruturais produzidas durante a replicação viral podem ser processadas e apresentadas aos linfócitos Tc. A via endógena de apresentação de antígenos aos linfócitos Tc está representada esquematicamente na Figura 9.5.

As DCs desempenham um papel muito importante no processo de apresentação de antígenos a outras células do sistema imunológico. As DCs podem ser infectadas por uma variedade de vírus e, assim, apresentar fragmentos de proteínas virais conjugadas com o MHC-I aos linfócitos Tc. Além de apresentar esses antígenos, as DCs fornecem estímulos químicos (citocinas) para a ativação integral desses linfócitos (Figura 9.6). As DCs podem detectar vírions ou proteínas virais através de receptores do tipo TLR 7 e 9, resultando em uma cascata de eventos intracelulares que as induzem a produzir citocinas e acelerar o seu

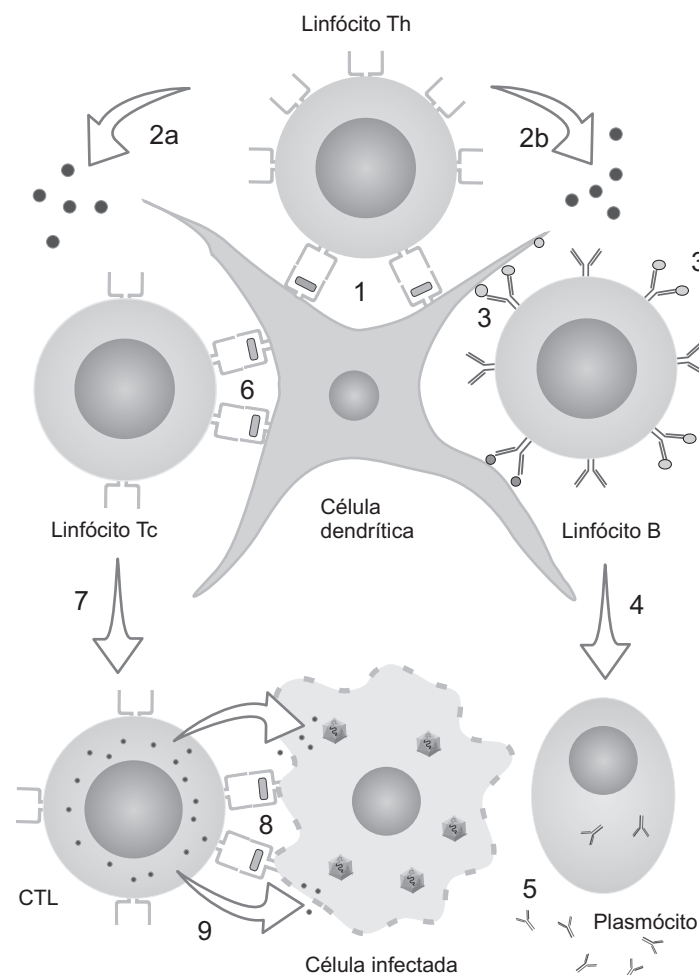


Figura 9.6. Interações entre as DCs e os linfócitos e estimulação da resposta adquirida. As DCs são capazes de apresentar peptídeos exógenos aos linfócitos Th (1), estimulando-os a produzir citocinas do tipo Th1 (2a) ou Th2 (2b). O reconhecimento de antígenos em solução ou nos icossomos da superfície das DCs (3), juntamente com as citocinas do tipo Th2, estimula os linfócitos B a proliferar (4) e se diferenciar em plasmócitos, que são células secretoras de anticorpos (5). Os linfócitos Tc podem reconhecer antígenos endógenos na superfície de células infectadas ou nas DCs (6). Este reconhecimento, juntamente com as citocinas do tipo Th1 (2a), ativa os linfócitos Tc que se tornam CTLs (7). Ao reconhecerem o mesmo padrão antigênico (MHC-I+ peptídeo viral) na membrana de células infectadas (8), os CTLs descarregam o seu arsenal citotóxico que resulta em apoptose e morte celular (9).

processo de maturação. As DCs possuem prolongamentos citoplasmáticos denominados dendritos, que aumentam a sua superfície, facilitando, com isso, a interação com as demais células do sistema imunológico. As DCs são capazes de capturar e armazenar antígenos em pequenas esferas na sua superfície, denominadas icossomos. Dessa forma, as DCs podem oferecer e transferir antígenos para outras DCs, para macrófagos e mesmo para os linfócitos B. As interações entre as DCs e as células envolvidas na resposta imune adquirida estão ilustradas na Figura 9.6

O contato entre os antígenos e as células do sistema imunológico – apresentação e reconhecimento de antígenos – ocorre principalmente nos linfonodos e outros tecidos linfóides secundários. Nesses tecidos, o microambiente existente favorece as interações entre o antígeno, as DCs e outras APCs, linfócitos T e B e células acessórias, resultando na estimulação eficiente de uma gama de células envolvidas com a resposta imunológica específica. Além de se constituir no evento central da imunidade adquirida, o reconhecimento de antígeno e a conseqüente estimulação de populações de linfócitos T e B representa a etapa inicial da resposta imunológica específica.

3.2 Resposta imune celular

A resposta imune específica mediada por células é representada pela atividade dos linfócitos T, pois a participação das demais células (macrófagos, DCs e células NK) faz parte da resposta inata e ocorre de forma inespecífica. Os mecanismos efetores dos linfócitos Th e Tc são distintos. Os linfócitos Th modulam a resposta imunológica através das citocinas, que agem estimulando e modulando a atividade de uma variedade de células do sistema imune. Os linfócitos Tc possuem a função precípua de identificar e destruir células infectadas por vírus.

De acordo com as citocinas produzidas, dois tipos de respostas mediadas por linfócitos Th podem ser identificadas: as respostas do tipo Th1 e Th2. A resposta do tipo Th1 é caracterizada pela secreção de IFN- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α . Essas citocinas atuam principalmente na estimulação da imunidade celular (linfócitos Tc, DCs, células

NK e macrófagos). A resposta do tipo Th2 caracteriza-se pela secreção de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, citocinas que atuam principalmente na ativação da imunidade humoral. Essas citocinas possuem papel importante na ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B e secreção de anticorpos, ou seja, as citocinas produzidas pelos Th em resposta ao antígeno estimulam tanto a resposta celular como a resposta humoral. O balanço entre as respostas do tipo Th1 e Th2 depende da biologia de cada vírus e de suas interações com o sistema imunológico.

A função principal dos Tc na resposta antiviral é a destruição de células infectadas por vírus. Para muitas infecções víricas, a resposta celular, mediada pelos Tc, representa a forma mais eficiente de combate e erradicação da infecção. A ativação dos linfócitos Tc ocorre após o reconhecimento de antígenos apresentados por células infectadas. Esta ativação depende de dois estímulos básicos: a estimulação resultante do reconhecimento dos complexos peptídeo-MHC-I na superfície das células infectadas e as citocinas produzidas pelas DCs ou pelos linfócitos Th ativados (Figura 9.6). Os complexos peptídeo-MHC-I são reconhecidos exclusivamente pelo TCR e CD8 dos linfócitos Tc. Após a sua ativação, esses linfócitos tornam-se competentes para destruir as células que apresentem o mesmo complexo peptídeo-MHC-I que induziu a sua estimulação. Esses complexos serão encontrados nas células que albergam o vírus infectante. Os linfócitos Tc ativados e capazes de destruir células infectadas são denominados CTLs (*cytotoxic T lymphocytes*). Ao entrar em contato com a célula infectada, os linfócitos Tc aderem a ela por meio do complexo TCR/CD8 e de outras moléculas de superfície. Essas interações resultam na reorganização do citoesqueleto, polarizando o linfócito Tc com o objetivo de descarregar o seu arsenal citotóxico sobre a célula infectada. Entre os componentes citotóxicos dos linfócitos Tc encontram-se as perforinas, que possuem a capacidade de induzir a formação de poros na célula-alvo. Os linfócitos Tc também secretam as granzimas, que penetram nas células através dos poros e ativam mecanismos intracelulares que culminam com a morte programada da célula (apoptose). Poste-

riormente, o linfócito Tc desprende-se da célula e parte em busca de novas células-alvo, característica que lhe confere o codinome de *serial killer* entre as células do sistema imunológico. O mecanismo de destruição celular pelos linfócitos Tc é similar ao desencadeado pelas células NK.

3.2.1 Importância dos linfócitos Tc na imunidade antiviral

Células infectadas por vírus podem produzir milhões de novas partículas virais em um período de poucas horas. A disseminação dos vírions entre as células ocorre pela liberação de partículas virais no meio extracelular ou pela transmissão direta dos vírions entre células. A transmissão direta entre células minimiza a possibilidade de um encontro indesejado dos vírions com as células e moléculas do sistema imunológico. Nesse caso, as únicas defesas das células infectadas são a produção de IFN-I e a apresentação dos antígenos virais associados ao MHC-I. Dessa forma, a presença do vírus no interior das células pode ser detectada pelas células vizinhas (via IFN-I) e pelos linfócitos Tc.

A estratégia do organismo em utilizar os linfócitos Tc para destruir precocemente células infectadas é muito apropriada, pois é preferível destruir pequenas fábricas de vírions a tentar inativar milhões de partículas víricas disseminadas no organismo e com o potencial de infectar novas células. O processamento e apresentação de proteínas virais aos linfócitos Tc em fases iniciais da infecção permite ao hospedeiro identificar e destruir as células infectadas antes do início da produção da progênie viral. Não obstante, alguns vírus desenvolveram estratégias para evitar ou retardar o reconhecimento de células infectadas, a fim de assegurar a conclusão do ciclo replicativo e a liberação de progênie viral.

3.3 Resposta imune humoral

A resposta específica humoral é mediada pelas imunoglobulinas (Igs), popularmente conhecidas como anticorpos. As Igs são produzidas e secretadas pelos plasmócitos, que são células originadas da proliferação e diferenciação dos

linfócitos B em resposta a antígenos (Figura 9.7). As Igs apresentam cinco classes principais, com estrutura e funções diferentes: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Imunoglobulinas das classes IgM e IgD são também encontradas na superfície dos linfócitos B, onde servem de receptores (BCRs) para o reconhecimento de antígenos por essas células.

Devido aos mecanismos de diversidade e especificidade, cada linfócito B e a sua progênie possuem BCRs idênticos entre si e com a capacidade para reconhecer um único determinante antigênico. Felizmente, o organismo possui bilhões de linfócitos B com BCRs diferentes e, por isso, capazes de reconhecerem e responderem a uma variedade virtualmente infinita de antígenos. A capacidade de reconhecimento de antígenos pelos linfócitos B depende exclusivamente do BCR e, conseqüentemente, os linfócitos B podem reconhecer antígenos solúveis e também antígenos não-proteicos. Ou seja, os linfócitos B reconhecem os antígenos em sua forma nativa, sem a necessidade de processamento e apresentação prévios, como ocorre com os linfócitos T.

A ativação dos linfócitos B depende da sua interação com os antígenos virais (via BCR) e da ação de citocinas secretadas pelos linfócitos Th, também em resposta ao reconhecimento do antígeno. As DCs desempenham um papel fundamental nesse processo, pois podem transferir antígenos aos linfócitos B por meio dos icossomos e, simultaneamente, apresentar antígenos aos linfócitos Th (Figuras 9.6 e 9.7).

Por outro lado, os linfócitos B, após reconhecerem um antígeno, podem interagir diretamente com os linfócitos Th, em um processo de estimulação recíproca. É importante ressaltar que os linfócitos B, além de secretarem imunoglobulinas, também são excelentes APCs, ou seja, podem apresentar antígenos associados ao MHC-II aos linfócitos Th. As citocinas produzidas pelos Th, juntamente com o reconhecimento do antígeno pelo BCR, resultam em estimulação, proliferação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, células secretoras de anticorpos. As DCs também podem fornecer citocinas importantes para uma adequada estimulação dos linfócitos B.

O contato com o antígeno e as citocinas produzidas pelos Th estimulam os linfócitos B a se

multiplicarem de forma rápida e abundante. As células resultantes dessa proliferação podem ter dois destinos: a grande maioria se diferencia em plasmócitos e uma minoria se diferencia em células de memória. Os plasmócitos possuem vida

relativamente curta; as células de memória possuem vida longa. Tanto os BCRs presentes na membrana dos linfócitos B de memória como as imunoglobulinas secretadas pelos plasmócitos possuem a mesma especificidade dos BCRs do

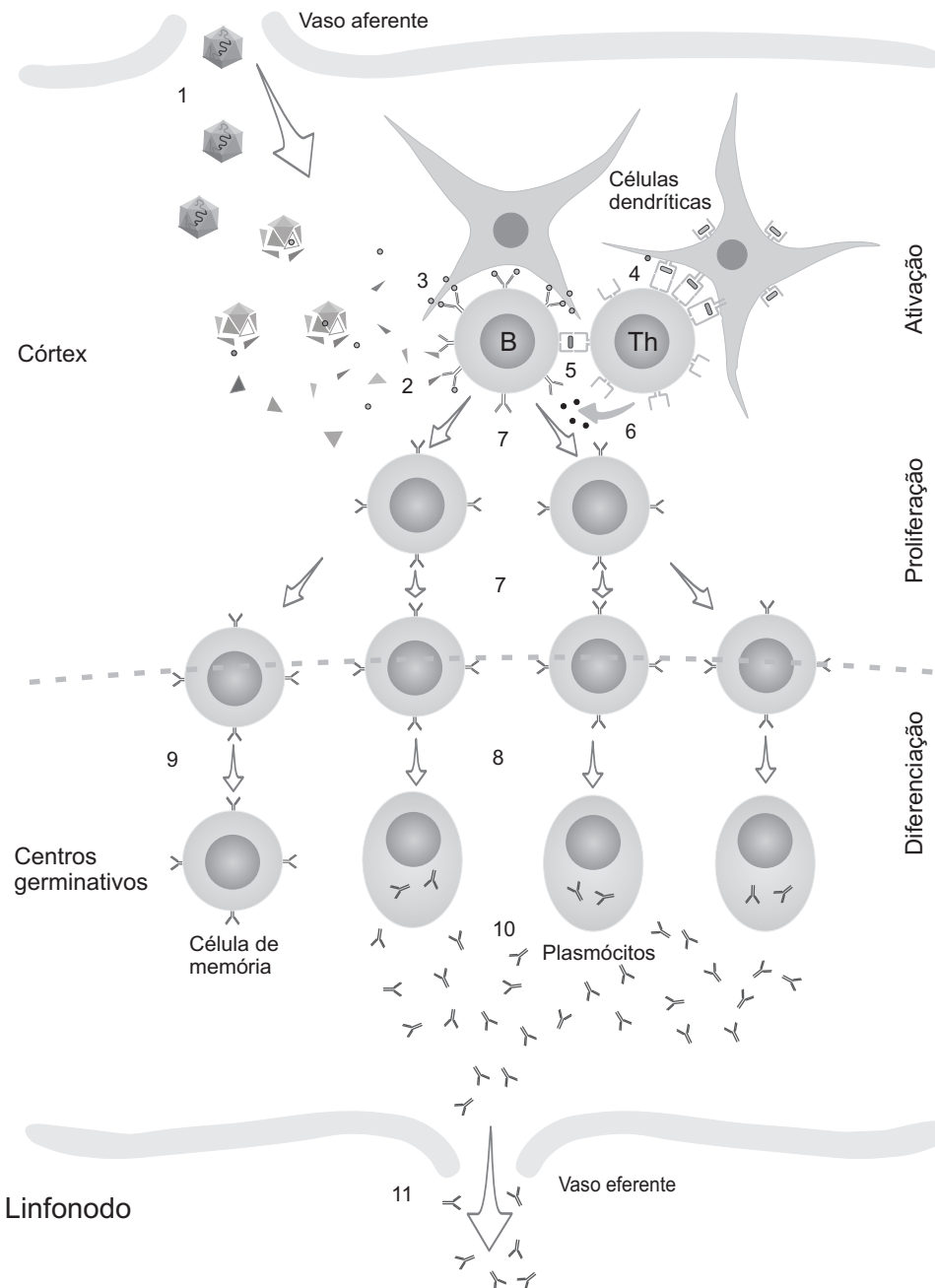


Figura 9.7. Mecanismos envolvidos na estimulação dos linfócitos B e produção de anticorpos. Partículas víricas ou antígenos virais drenados pela linfa nos tecidos periféricos penetram nos linfonodos pelos vasos aferentes (1). Esses antígenos podem ser reconhecidos diretamente pelos linfócitos B (2) ou em ícosomos na superfície das DCs (3). Tanto as DCs como os linfócitos B podem processar e apresentar antígenos virais aos linfócitos Th (4, 5), que secretam citocinas em resposta (6). Estas citocinas atuam nos linfócitos B, estimulando a sua proliferação (7) e diferenciação em plasmócitos (8) ou em células de memória (9). Os plasmócitos secretam grande quantidade de anticorpos (10) que têm acesso aos líquidos corporais (11). Células fagocíticas e/ou DCs podem também penetrar nos linfonodos já com antígenos virais capturados nos tecidos periféricos e os apresentar aos linfócitos Th e B.

linfócito B que os deu origem. A estimulação e proliferação dos linfócitos B ocorrem nos órgãos linfóides secundários, sobretudo nos linfonodos. Os anticorpos produzidos são secretados no meio extracelular e através dos vasos eferentes podem ter acesso à corrente sanguínea e, posteriormente, aos tecidos. Os processos de reconhecimento do antígeno, proliferação e diferenciação dos linfócitos B estão ilustrados esquematicamente na Figura 9.7.

3.4 Respostas primária e secundária/memória imunológica

Os linfócitos possuem um período de vida relativamente curto após a sua produção a partir dos progenitores linfóides na medula óssea. No entanto, a sua sobrevivência pode ser prolongada desde que encontrem o antígeno que os estimule a proliferar e se diferenciar, ou seja, os linfócitos que não encontram o antígeno que os estimule possuem vida curta; aqueles que encontram o antígeno complementar ao seu BCR têm a sua vida prolongada. Dessa forma, a presença de antígenos específicos no organismo literalmente resgata os linfócitos da morte, estimulando-os a proliferar e se diferenciar, gerando uma resposta imune, denominada *resposta primária*. O principal evento da resposta primária é a expansão dos clones de linfócitos que possuem receptores para os antígenos introduzidos pela primeira vez no organismo. Porém, a maioria das células originadas pela expansão clonal se diferenciara em células de vida curta, os plasmócitos. Os plasmócitos exercem a sua função de secreção de Igs e sobrevivem por algumas semanas ou meses. Felizmente, após a expansão clonal, uma fração pequena dos linfócitos estimulados não se diferencia em plasmócitos, e sim em células de memória. Estas mantêm a capacidade de reconhecimento do mesmo antígeno que as estimulou (pois possuem os BCRs com especificidade idêntica aos da célula original) e sobrevivem no organismo por um longo tempo. As células de memória habitam a medula óssea e circulam pelo organismo. Ao encontrarem o mesmo antígeno que as estimulou previamente (vírions ou proteínas virais), essas células respondem rapidamente, produzindo

uma resposta proliferativa e de diferenciação rápida e intensa. Essa resposta é denominada resposta imune secundária. Embora mais estudados em linfócitos B, pela facilidade de quantificação dos anticorpos, os eventos envolvidos na resposta primária e secundária provavelmente ocorram de forma semelhante aos linfócitos T. A resposta primária a um determinado vírus pode resultar de infecção natural ou de vacinação e prepara o sistema imunológico para responder e montar uma resposta secundária caso ocorra uma reexposição posterior ao agente.

A memória imunológica de linfócitos B e T é diferente. A produção contínua de anticorpos específicos tem sido detectada várias décadas após a infecção por alguns vírus. Como a vida média dos anticorpos no organismo é de poucas semanas, isto indica que ocorre uma produção contínua de anticorpos para que os níveis sejam mantidos. Uma possível explicação para esse fato é de que linfócitos B de memória seriam constantemente reestimulados a se diferenciarem em plasmócitos secretores de Igs, pois os plasmócitos possuem vida curta. O contato frequente com o antígeno – e as conseqüentes reestimulações – podem decorrer da reexposição ao próprio microorganismo ou resultar de reatividade cruzada com antígenos semelhantes, próprios ou heterólogos. Além disso, recentemente foi observado que as DCs possuem a capacidade de armazenar antígenos em seus dendritos por períodos prolongados e liberá-los lentamente para os linfócitos de memória, provocando a sua reestimulação contínua. Isso poderia proporcionar uma estimulação prolongada não somente dos linfócitos de memória, mas também de linfócitos que ainda não haviam sido estimulados (*naïve* ou virgens). Estes, ao chegarem aos órgãos linfóides, encontrariam com o antígeno pela primeira vez, gerando novamente uma resposta imune primária e, conseqüentemente, a produção de mais linfócitos de memória.

Ao contrário da fase efetora da resposta humoral – cuja produção de anticorpos pode persistir por longos períodos – a fase efetora da resposta celular é de curta duração. A presença prolongada de linfócitos Th e Tc efetores seria deletéria para o organismo, pois a secreção persistente de

citocinas e a atividade citolítica continuada poderiam resultar em imunopatologia. Após a fase efetora, as células T de memória são encontradas com frequência mais alta e podem responder com mais rapidez e eficiência a estímulos antigênicos secundários. A rapidez e eficiência com que as células T de memória se deslocam para os sítios de infecção e respondem a estímulos secundários faz com que não seja necessária a preexistência de células efetoras para gerar uma resposta protetora.

Uma das questões fundamentais na resposta imune está relacionada com os mecanismos que garantem a sobrevivência e manutenção das células T e B de memória. A estabilidade da memória dos linfócitos Tc, por exemplo, é mantida por divisões celulares lentas e continuadas. As células B de memória podem ser mantidas por estimulações paralelas, ou seja, por citocinas produzidas pelas células Th e DCs em resposta a outros antígenos. No entanto, embora a medula óssea apresente o ambiente ideal para a manutenção, replicação e sobrevivência dessas células, acredita-se que a reexposição e contato com o antígeno sejam importantes para a manutenção das células B de memória. Com isso, as reestimulações contribuiriam para a reposição das células secretoras de Igs e a conseqüente manutenção dos níveis de anticorpos circulantes.

O conhecimento dos eventos que ocorrem durante a resposta primária e secundária é fundamental para o entendimento das bases imunológicas da proteção induzida por vacinas. A vacinação induz uma resposta primária, com a conseqüente expansão de clones de linfócitos B e T específicos para os antígenos vacinais. Com isso, são produzidos plasmócitos e linfócitos T efetores, que possuem vida curta; e, principalmente, células B e T de memória, que possuem vida longa e são capazes de responder ao mesmo padrão antigênico que induziu a sua proliferação. A infecção subsequente de um animal vacinado irá induzir uma resposta secundária, com estimulação e proliferação muito mais rápida e intensa de linfócitos T e B, pois o número dessas células específicas para o antígeno agora é muito maior, resultado da expansão clonal da resposta primária. Esta infecção resulta em estimulação

dos linfócitos de memória, que proliferam e se diferenciam em células efetoras, a exemplo do que ocorreu na resposta primária, porém com muito maior eficiência e rapidez. O resultado é a produção de linfócitos Th e Tc efetores e de plasmócitos secretores de anticorpos, que se encarregam de combater o vírus invasor.

3.5 As imunoglobulinas na defesa antiviral

A importância dos anticorpos na imunidade antiviral tem sido muito discutida e parece variar de acordo com a biologia do vírus e também com o estágio da infecção (infecção primária versus reinfecção). Como os anticorpos aparecem apenas tardiamente durante a infecção primária, acredita-se que desempenhem um papel secundário na erradicação dessa infecção. O papel principal nesses casos seria assumido pelos linfócitos Tc. Os anticorpos teriam participação mais efetiva na proteção em casos de reinfecção, quando atuariam limitando e restringindo a penetração e disseminação do vírus no organismo. Além dessa diferença, a importância relativa dos anticorpos e da imunidade celular variam de acordo com a biologia e interações de cada vírus com o hospedeiro.

Os principais locais de produção de anticorpos pelos plasmócitos são os centros germinativos dos linfonodos e as regiões equivalentes dos outros órgãos linfóides secundários. As Igs estão presentes nos fluidos do organismo (plasma sanguíneo, saliva, lágrima, urina, colostro/leite, muco, secreções, líquido céfalo-raquidiano e líquido sinovial) e são capazes de se ligar especificamente no determinante antigênico que induziu a sua formação. Para várias infecções virais, a quantidade de Igs específicas presentes no soro sanguíneo pode ser correlacionada com proteção. Por isso, esse parâmetro é utilizado para o monitoramento dos prováveis níveis de proteção e da necessidade de novas imunizações. Considerando-se que a resistência antiviral deve-se, em grande parte, à atividade dos linfócitos Tc (que efetivamente destroem células infectadas), a quantificação dos anticorpos não pode ser considerada o indicador único de proteção. Não obs-

tante, a sorologia é muito utilizada para se avaliar os níveis de imunidade como um todo, visto que os métodos para detectar e quantificar a função de linfócitos T são de difícil aplicação.

3.5.1 Mecanismos de ação das imunoglobulinas

As Igs possuem várias atividades biológicas que potencialmente podem estar envolvidas na resposta antiviral. Algumas dessas atividades já foram demonstradas *in vivo* e a sua participação na resposta antiviral parece ser inquestionável; outras somente foram demonstradas inequivocadamente *in vitro* e/ou possuem um papel controverso na resposta imunológica contra os vírus. A seguir são listadas as principais atividades antivirais dos anticorpos (essas atividades na defesa contra vírus estão ilustradas na Figura 9.8):

- Neutralização: a interação dos vírions com os receptores celulares para o início da infecção é mediada por regiões específicas das proteínas de superfície dos vírions (anti-receptores). Anticorpos produzidos contra essas regiões possuem a capacidade de se ligar aos vírions e impedir a interação com os receptores celulares, neutralizando a sua infectividade. Esses anticorpos são denominados genericamente *neutralizantes* e constituem uma parcela do total de anticorpos produzidos contra os vírus. Anticorpos com atividade neutralizante são direcionados contra proteínas de superfície dos vírions. A neutralização de partículas virais pode ocorrer por Igs da classe IgA, presente nas mucosas e em secreções; ou por IgM e IgG, presentes no plasma sanguíneo. Um dos desafios da vacinologia é a indução de proteção sólida nas mucosas, pela estimulação de IgA com capacidade de neutralizar as partículas víricas nos locais mais frequentes de penetração viral (sistema respiratório, digestório e reprodutivo) e, assim, impedir a instalação da infecção. A neutralização da infectividade é o mecanismo mais direto de ação dos anticorpos contra vírus e, talvez, o mais importante;

- Aglutinação: as IgM e IgG possuem a capacidade de aglutinar partículas virais e, com isso, facilitar a sua remoção mediada pelo sistema complemento e por células fagocíticas;

- Opsonização: o revestimento de partículas víricas por moléculas de imunoglobulinas (IgM e IgG) facilita a ligação e remoção dessas partículas pelas células fagocíticas, via receptores para a porção Fc das Igs. A ativação do sistema do complemento também gera fragmentos capazes de opsonização viral (C3b);

- Ativação do complemento: a ligação das Igs aos antígenos resulta em alterações tridimensionais na sua região Fc, expondo sítios de ligação para o componente C1 do complemento, iniciando a sua ativação em cascata. O resultado é a estimulação de vários mecanismos da imunidade inata (vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, quimiotaxia para fagócitos, entre outros) e a formação do MAC sobre a superfície dos vírions, o que pode resultar na inativação da infectividade dos vírus envelopados. A ligação de anticorpos em proteínas virais inseridas na membrana de células infectadas pode ativar o complemento e levar à formação do MAC. Com isso, a célula infectada pode sofrer lise osmótica. Esse mecanismo pode também ocorrer com bactérias;

- Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC): durante a replicação de alguns vírus, certas proteínas virais podem ser inseridas na membrana plasmática da célula infectada. Anticorpos específicos são produzidos contra essas proteínas e se ligam a elas na superfície celular. Com isso, a célula infectada se torna alvo para algumas células do sistema imunológico que possuem receptores para a porção Fc das Igs (células NK e neutrófilos) e destroem a célula. Embora a ADCC tenha sido amplamente demonstrada *in vitro*, a sua importância *in vivo* ainda é desconhecida;

- Outras atividades dos anticorpos: embora as Igs desempenhem funções benéficas para a manutenção da integridade e funcionalidade do organismo, pelo combate a agentes infecciosos potencialmente nocivos, eventualmente podem participar de processos que são prejudiciais ao hospedeiro. A presença de grande quantidade de antígenos no plasma sanguíneo pode levar à formação disseminada de complexos antígeno-anticorpo. Esses complexos geralmente são removidos pelas células fagocíticas. No entanto, quando estão em excesso, depositam-se em locais

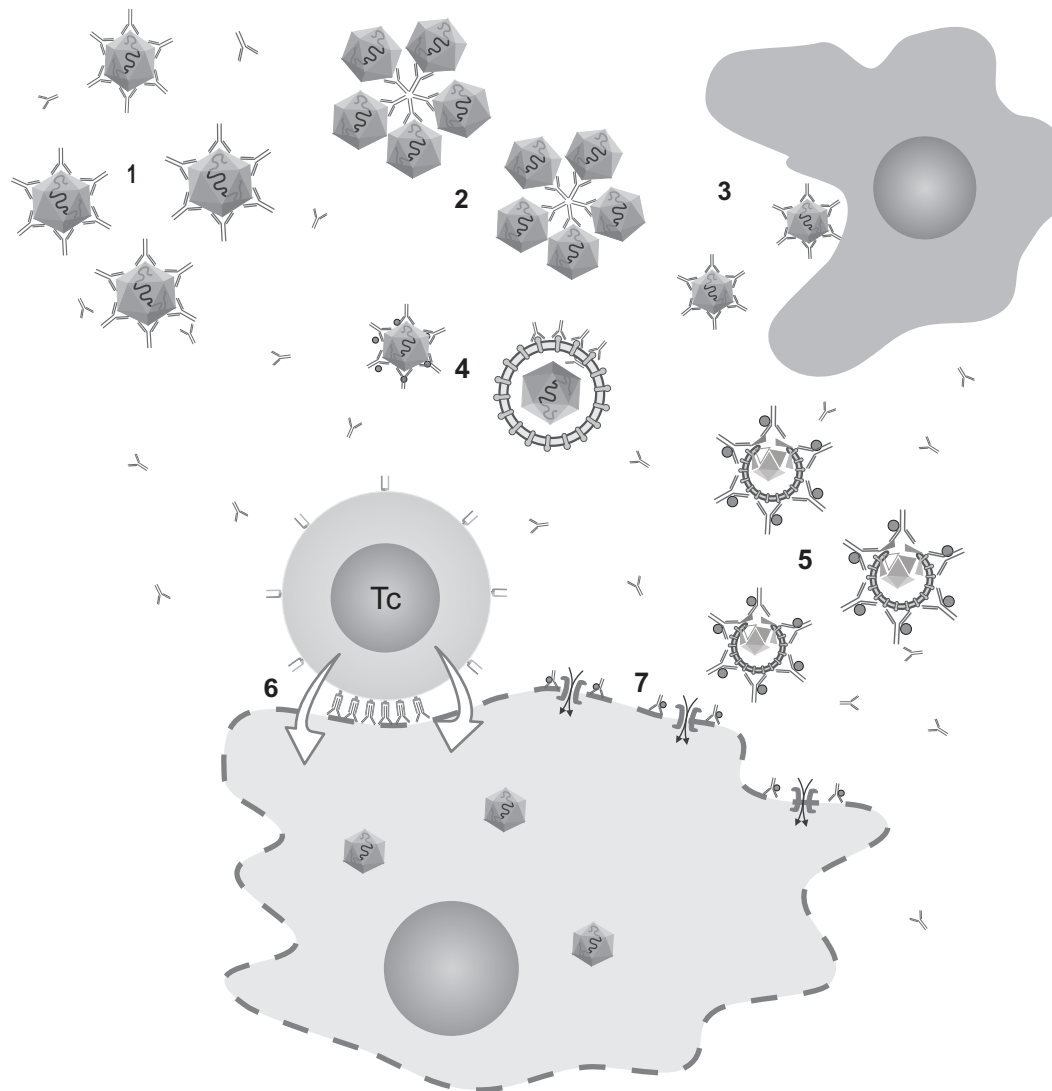


Figura 9.8. Atividades dos anticorpos na resposta contra vírus. Neutralização da infectividade (1), aglutinação (2), opsonização e fagocitose (3), ativação do complemento (4), lise de vírus envelopados mediada por complemento (5), ADCC (6) e lise celular mediada por complemento dependente de anticorpos (7).

como as superfícies articulares e túbulos renais e, freqüentemente, causam imunopatologia. O revestimento de vírions com anticorpos sem atividade neutralizante pode, ao invés de neutralizá-lo, potencializar a sua infectividade. Essas Igs são reconhecidas por células que possuem receptores para a porção Fc (monócitos e macrófagos), resultando na internalização eficiente de vírions recobertos com anticorpos, facilitando a infecção dessas células, ou seja, os anticorpos aumentam a eficiência de penetração desses vírions. Esse mecanismo é denominado *Antibody Dependent Enhancement* (ADE) e tem sido descrito para vá-

rios vírus, dentre os quais o vírus da dengue, o coronavírus felino e o vírus da imunodeficiência humana (HIV). O papel da ADE na patogenia dessas doenças, no entanto, ainda é tema de debates.

3.6 O papel das respostas celular e humoral na imunidade antiviral

Os avanços no estudo da imunologia antiviral têm resultado na emergência de importantes componentes e mecanismos anteriormente relegados a papéis secundários na resposta imune,

como as DCs. No entanto, o papel exato de cada componente na intrincada cadeia de relações celulares e moleculares que resultam na eliminação de uma determinada infecção vírica ainda não está satisfatoriamente esclarecido. O esclarecimento desses mecanismos depende do entendimento detalhado da biologia e da patogenia de cada infecção e das interações peculiares de cada vírus com o sistema imunológico. Não obstante, pode-se afirmar que os linfócitos Tc são fundamentais na erradicação da infecção primária, pela destruição das células infectadas. Os anticorpos não teriam grande participação no combate à infecção primária, pois aparecem tardiamente no curso da infecção. Seriam de fundamental importância por ocasião de uma reexposição ao agente, prevenindo e/ou limitando a infecção através de neutralização viral e de outros mecanismos que restringiriam a disseminação do vírus no organismo. Caberia aos linfócitos Th o papel de coordenar e moderar as duas respostas (humoral, mediada por linfócitos B; e celular, mediada por linfócitos Tc) pela secreção de citocinas.

4 Mecanismos virais de evasão da resposta imune

A ocorrência contínua de doenças virais somente é possível devido ao sucesso desses microorganismos em produzir infecções, resistir ou escapar dos mecanismos antivirais do hospedeiro e se disseminar para outros hospedeiros susceptíveis. Hospedeiros imunes impedem a progressão da infecção, o que reduz drasticamente a possibilidade de transmissão do vírus para outros animais. Dezenas ou centenas de milhares de anos de coexistência, além da rapidez com que os vírus se multiplicam e evoluem geneticamente, permitiram o desenvolvimento de estratégias que lhes permitem evitar ou resistir às defesas do hospedeiro, causando infecções produtivas, agudas ou crônicas, e garantindo a sua manutenção e perpetuação na natureza. Dentre os mecanismos utilizados pelos vírus para compatibilizar a sua existência e perpetuação, apesar dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, destacam-se os seguintes: infecções latentes no sistema nervoso central, variações antigênicas, indução de

tolerância, integração do material genético viral no genoma do hospedeiro, infecção de sítios imunologicamente privilegiados e interferência com funções do sistema imunológico.

4.1 Infecções latentes no sistema nervoso central

O estabelecimento de infecções latentes é um eficiente mecanismo de perpetuação no hospedeiro utilizado pelos vírus da família *Herpesviridae*. A fase de latência, que se segue à infecção aguda, é caracterizada pela presença do genoma viral inativo em neurônios, sem síntese protéica ou produção de progênie viral. Como consequência, a infecção desses neurônios não é detectada pelo sistema imunológico e essas células podem manter o material genético viral indefinidamente. No entanto, sob determinadas circunstâncias, geralmente associadas com estresse, ocorre a reativação e a retomada da replicação viral nos neurônios infectados. Os vírions produzidos migram pelos axônios de volta aos locais de replicação primária, de onde são excretados, podendo infectar outros hospedeiros. O estabelecimento e reativação de infecções latentes, portanto, constituem-se em estratégias dos herpesvírus para escapar do sistema imunológico e garantir a sua perpetuação no hospedeiro e na população. Infecções latentes ocorrem com os herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BoHV-1 e 5), herpesvírus suíno (doença de Aujeszky), herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1), herpesvírus eqüinos tipo 1 e 4 (EHV-1 e 4), entre outros.

4.2 Variações antigênicas

Alterações na sequência de aminoácidos de determinantes antigênicos em proteínas de superfície dos vírions permite o escape da neutralização por anticorpos e é uma estratégia muito utilizada pelos vírus, principalmente os vírus RNA. Essas alterações surgem como resultado dos erros cometidos pela enzima RNA polimerase viral durante a replicação do genoma. Como consequência, aminoácidos diferentes são frequentemente incorporados durante a síntese das proteínas virais, alterando a sua sequência e es-

trutura, podendo resultar no não-reconhecimento pelos anticorpos produzidos contra os epitopos originais. Vírions com alterações antigênicas podem, assim, escapar da resposta imune existente naquele momento no hospedeiro, principalmente da imunidade humoral, e infectar novas células. A presença desses novos determinantes antigênicos elicitará a síntese de anticorpos com uma nova especificidade. Porém, novas variações poderão ser posteriormente produzidas e novamente alguns variantes podem escapar da neutralização. Essas variações antigênicas discretas, geralmente associadas com a acumulação de mutações em ponto, são denominadas genericamente de *antigenic drift* e têm sido bem caracterizadas nos vírus da influenza, embora ocorram também em outros vírus. Alterações antigênicas mais drásticas ocorrem quando os vírus da influenza trocam entre si os genes que codificam as proteínas do envelope (HA e NA), resultando em vírus antigenicamente muito diferentes dos parentais. Esse mecanismo é denominado *antigenic shift* e tem sido implicado no surgimento de vírus de maior patogenicidade, responsáveis por epidemias de grandes proporções.

4.3 Indução de tolerância

Em condições normais, o sistema imunológico possui tolerância, ou seja, não reage contra os antígenos do próprio organismo. Ocasionalmente o sistema imunológico pode se tornar tolerante também a antígenos estranhos, contra os quais deveria produzir uma resposta. Um exemplo é o que ocorre quando fetos bovinos são infectados por cepas não-citopáticas do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) entre os 40 e 120 dias de gestação. Nessa fase, o sistema imunológico do feto ainda está imaturo e não reconhece os antígenos virais como estranhos. Com isso, não ocorre a estimulação e proliferação de linfócitos B e T e, como consequência, o feto fica incapaz de montar uma resposta contra o vírus. Os fetos imunotolerantes nascem persistentemente infectados (PI) pelo BVDV e excretam o vírus continuamente em secreções e excreções. Os animais PI se constituem no ponto-chave da epidemiologia do BVDV, pois são fontes contínuas de vírus para os outros ani-

mais. Essa condição só é possível pela tolerância do sistema imunológico aos antígenos virais.

4.4 Integração do material genético viral no genoma do hospedeiro

Os vírus da família *Retroviridae* podem persistir no hospedeiro durante toda a sua vida, mesmo na presença da resposta imune. O mecanismo de persistência resulta de dois aspectos da biologia desses vírus: a) possuem a capacidade de inserir cópias do seu genoma nos cromossomos das células hospedeiras e b) possuem a enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição reversa do genoma (RNA para DNA), mas que não corrige os seus próprios erros. Com isso, a cada ciclo são produzidas populações de vírus compostas por indivíduos com pequenas diferenças genéticas entre si (*quasiespecies*). A inserção do material genético viral garante que a infecção seja permanente, e as alterações antigênicas que resultam de cada ciclo de replicação viral asseguram que alguns vírions produzidos possam escapar da resposta imune para infectar novas células. Dentre as infecções por retrovírus animais destacam-se a anemia infecciosa equina e a imunodeficiência felina.

4.5 Infecção de sítios imunologicamente privilegiados

Os tecidos e órgãos aos quais os componentes do sistema imunológico não possuem acesso imediato e irrestrito são denominados genericamente sítios de privilégio. Os neurônios do SNC, por exemplo, não expressam de forma constitutiva as moléculas do MHC-I, o que dificulta o reconhecimento da infecção celular e a ação dos linfócitos Tc. Conseqüentemente, os vírus que infectam neurônios são privilegiados, pois as células hospedeiras não denunciam a sua presença. Por outro lado, a falta de expressão de moléculas do MHC-I pode ser considerada um mecanismo de proteção, evitando a destruição de células tão importantes. Da mesma forma, a barreira hematoencefálica restringe o acesso de algumas células imunológicas ao SNC. São também considerados sítios de privilégio as células da epiderme (onde

ocorrem infecções pelos vírus da papilomatose), as células germinativas das gônadas (onde pode ocorrer a infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, PRRSV), retina, células dos túbulos renais (utilizadas pelos hantavírus e arenavírus) e tecidos fetais (diversos vírus).

4.6 Interferência com funções do sistema imunológico

Os estudos sobre as relações vírus-célula e sobre a biologia dos vírus permitiram elucidar vários mecanismos utilizados pelos vírus para subverter o sistema imunológico, por meio da interferência com a função das células e moléculas imunológicas. Essa interferência freqüentemente leva a deficiências na resposta imunológica, consequências denominadas genericamente de imunossupressão. Cada vírus utiliza uma estratégia específica, dependendo da sua biologia, o que torna impraticável enumerá-las aqui. No entanto, como mecanismos gerais, citam-se: a) destruição, inibição ou indução da maturação das DCs, o que altera o padrão de secreção de citocinas e de expressão de receptores nas DCs, resultando em prejuízo nas suas relações com as demais células do sistema imunológico, principalmente os linfócitos T; b) destruição ou alteração das funções dos linfócitos T; c) interferência com a apresentação de antígenos, inibindo a ação das proteínas TAP-1 e TAP-2 e inibição da formação do complexo peptídeo-MHC-I no retículo endoplasmático (RE); d) produção de proteínas que inibem a função das citocinas; e) produção de proteínas que protegem a célula infectada da ação do IFN-I e do TNF- α e f) infecção dos linfócitos B, induzindo alteração na secreção de imunoglobulinas.

5 Considerações finais

É inquestionável o avanço no entendimento dos mecanismos imunológicos estimulados durante as infecções víricas. Os imunologistas aprendem imunologia com os vírus, cujas interações com o sistema imunológico são repletas de estratégias para driblar ou conviver com os mecanismos imunológicos e, assim, perpetuar-se nas

espécies animais. Observando a trajetória desses fascinantes microorganismos e de suas complexas interações celulares e moleculares, percebe-se o quanto ainda há para descobrir em relação aos mecanismos imunológicos protetores. Tanto é verdade que o surgimento do HIV renovou o interesse dos pesquisadores pela imunologia. A partir de então, o descobrimento de novas infecções e o desafio de vencer velhos conhecidos fez da imunologia uma das áreas do conhecimento que mais rapidamente acumula informações.

Paralelamente aos avanços no conhecimento das interações dos vírus com o sistema imunológico – e dos mecanismos utilizados por esses agentes para se perpetuarem no hospedeiro – surgem importantes linhas de pesquisa na área de desenvolvimento de vacinas. Um dos maiores avanços dos últimos anos foi a elucidação do papel central das DCs na resposta às infecções virais. Essas células se constituem no elo de ligação entre mecanismos imunológicos naturais e específicos. Juntamente com a descoberta da importância das DCs, novos questionamentos direcionam as investigações futuras que, necessariamente, deverão considerar a manipulação de vetores virais para maximizar a resposta imune com vistas à produção de vacinas.

6 Bibliografia consultada

-
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 2000. 553p.
- AHMED, R.; BIRON, C.A. Immunity to viruses. In: PAUL, W.E. (ed). **Fundamental immunology**. 4.ed. New York: Lippincott-Raven, 1998. *Cap.39*, p.1295-1334.
- BERTRAM, E.M.; DAWICKI, W.; WATTS, T. Role of T cell co-stimulation in antiviral immunity. **Seminars in Immunology**, v.16, p.185-196, 2004.
- BERZOFISKY, J.A.; BERKOWER, I.J. Immunogenicity and antigen structure. In: PAUL, W.E. (ed). **Fundamental immunology**. 4.ed. New York: Lippincott-Raven, 1998. *Cap.19*, p.651-699.
- BROWN, D.M.; ROMÁN, E.; SWAIN, S.L. CD4 T cells responses to influenza infection. **Seminars in Immunology**, v.16, p.171-177, 2004.
- CROTTY, S.; AHMED, R. Immunological memory in humans. **Seminars in Immunology**, v.16, p.197-203, 2004.

- DOHERTY, P.C.; AHMED, R. Immune responses to viral infection. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral Pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.7, p.143-161.
- FENNER, F.J. et al. Immune response to viral infections. In: _____. **Veterinary virology**. 2.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1993. Cap.8, p.137-158.
- FLINT, S.J. et al. Prevention and control of viral diseases. In: _____. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. Cap.19, p.662-714.
- FLINT, S.J. et al. Viruses offense meets host defense. In: _____. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. Cap.14, p.478-516.
- GORDON, S. Macrophages and the immune response. In: PAUL, W.E. (ed). **Fundamental immunology**. 4.ed. New York: Lippincott-Raven, 1998. Cap.15, p.533-545.
- HAERYFAR, S.M. The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? **Trends in Immunology**, v.26, p.311-317, 2005.
- HAMERMAN, J.; OGASAWARA, K.; LANIER, L.L. NK cells in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.17, p.29-35, 2005.
- JANEWAY Jr, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.197-216, 2002.
- KLEIN, J.; HOREJSI, V. Defence against invaders. In: _____. **Immunology**. 2.ed. Malden, MA: Backwell Science, 1997. Cap.21, p.532-595.
- KLEIN, J.; HOREJSI, V. T-Lymphocyte and natural killer cell responses. In: _____. **Immunology**. 2.ed. Malden, MA: Backwell Science, 1997. Cap.16, p.465-482.
- LARSSON, M.; BEIGNON, A.S.; BHARDWAJ, N. DC-virus interplay: a double edged sword. **Seminars in immunology**, v.16, p.147-161, 2004.
- LEE, S.H.; JUNG, J.U.; MEANS, R.E. 'Complementing' viral infection: mechanisms for evading innate immunity. **Trends in Microbiology**, v.11, p.449-452, 2003.
- MCHEYZER-WILLIAMS, L.J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M.G. Antigen-specific memory B cell development. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.487-513, 2005.
- NOSSAL, G.J.V. Vaccines. In: PAUL, W.E. (ed). **Fundamental Immunology**. 4.ed. New York: Lippincott-Raven, 1998. Cap.42, p.1387-1425.
- STEINMAN, R.M. Dendritic cells. In: PAUL, W.E. (ed). **Fundamental immunology**. 4.ed. New York: Lippincott-Raven, 1998. Cap.16, p.547-573.
- TORTORELLA, D. et al. Viral subversion of the immune system. **Annual Review of Immunology**, v.18, p.861-926, 2000.
- WELSH, R.M.; SELIN, L.K.; SZOMOLANYI-TSUDA, E. Immunological memory to viral infections. **Annual Review of Immunology**, v.22, p.711-743, 2004.
- WHITTON, J.L.; OLDSTONE, M.B.A. Immune response to viruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.12, p.345-374.
- WODARZ, D.; CHRISTENSEN, J.P.; THOMSEN, A.R. The importance of lytic and nonlytic immune responses in viral infections. **Trends in Immunology**, v.23, p.194-200, 2002.
- WOODLAND, D.L.; RANDALL, T.R. Anatomical features of antiviral immunity in the respiratory tract. **Seminars in Immunology**, v.16, p.163-170, 2004.
- YEWDELL, J.W.; HAERYFAR, S.M. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.651-682, 2005.
- YOKOYAMA, W.M.; KIM, S.; FRENCH, A.R. The dynamic life of natural killer cells. **Annual Review of Immunology**, v.22, p.405-429, 2004.
- ZINKERNAGEL, R.M. Virus-induced immunopathology. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.8, p.163-179.

1 Introdução	263
2 A cadeia do processo infeccioso	263
2.1 Fontes de infecção	265
2.2 Vias de excreção	269
2.3 Mecanismos de transmissão	270
2.4 Vias de penetração	273
2.5 O novo hospedeiro	274
2.5.1 Patogenia e resposta imunológica	274
3 Mecanismos de perpetuação dos vírus na natureza	275
3.1 Infecções persistentes	276
3.2 Infecções latentes	276
3.3 Infecção de várias espécies animais	277
3.4 Infecção de vetores	279
3.5 Sobrevivência no ambiente	279
3.6 Transmissão vertical	280
3.7 Ciclos contínuos de transmissão	281
4 Doenças em populações	281
4.1 Definição de população	281
4.2 População de risco	282
4.3 Populações abertas e fechadas	282
4.4 Quantificação de doença: incidência e prevalência	283
5 Padrões temporais de ocorrência das doenças víricas	284
5.1 Doenças esporádicas	284
5.2 Doenças endêmicas	285
5.3 Doenças epidêmicas	285
5.4 Fatores determinantes das epidemias	287
5.5 Outros padrões de ocorrência	287

6 Distribuição espacial das doenças víricas	288
6.1 Doenças de distribuição mundial	288
6.2 Doenças com certa limitação geográfica	289
6.3 Doenças restritas geograficamente	289
6.4 Áreas livres naturais	289
6.5 Áreas livres artificiais	290
7 Doenças víricas emergentes	290
8 Bibliografia consultada	293

1 Introdução

A epidemiologia estuda as doenças em populações, investigando os seus determinantes, a sua dinâmica e distribuição. Os fatores envolvidos na manutenção e transmissão das infecções víricas nas populações são múltiplos e participam de interações complexas, às vezes, de difícil compreensão. A complexidade dessas interações é muito variável entre as viroses. Existem infecções víricas que são mantidas na população por uma cadeia sucessiva de infecções agudas entre hospedeiros de uma única espécie animal. Essas infecções apresentam, portanto, uma epidemiologia relativamente simples. Outras viroses conseguem persistir na população graças a infecções persistentes ou latentes. Por outro lado, alguns vírus desenvolveram a capacidade de infectar várias espécies de hospedeiros e a sua manutenção, na natureza, é possível pela ocorrência de ciclos alternados de infecção nessas espécies.

Infecção de espécies silvestres, transmissão por artrópodes, longos períodos de incubação ou de sobrevivência no meio ambiente, transmissão vertical, variabilidade genética e antigênica, entre outras, fazem parte do arsenal de estratégias utilizadas pelos vírus para assegurar a sua sobrevivência como espécie. Alguns vírus fazem uso concomitante de várias dessas estratégias, o que torna a sua epidemiologia extremamente complexa, favorecendo a sua manutenção no ambiente e dificultando o seu controle.

Os principais objetivos das investigações epidemiológicas são o conhecimento dessas cadeias de interações e a identificação de pontos frágeis que sejam passíveis de intervenção, visando ao controle das doenças. A ênfase maior da epidemiologia é a população – a sua saúde e bem-estar. A importância do indivíduo limita-se à sua condição de componente da população, pois, como tal, pode originar informações úteis para a preservação da saúde coletiva.

Este capítulo aborda, de forma genérica, os principais aspectos da epidemiologia das infecções víricas de animais. Os aspectos epidemiológicos mais relevantes de cada virose serão abordados oportunamente nos capítulos específicos. A epidemiologia aplicada às doenças animais possui uma terminologia própria (epizootiologia, epizootia, enzootia etc.). Este texto, no entanto, utilizará a terminologia clássica (epidemia, endemia etc.), consagrada ao longo de décadas na descrição de doenças humanas, mas que também tem sido utilizada em epidemiologia veterinária.

2 A cadeia do processo infeccioso

A sobrevivência de um vírus como espécie depende de sua capacidade de cumprir uma sequência de etapas que se convencionou chamar de *cadeia do processo infeccioso*. Para facilitar o seu entendimento, a cadeia do processo infeccioso pode ser dividida nas seguintes etapas: fontes de infecção, vias de excreção, mecanismos de transmissão, vias de penetração e o novo hospedeiro (Figura 10.1).

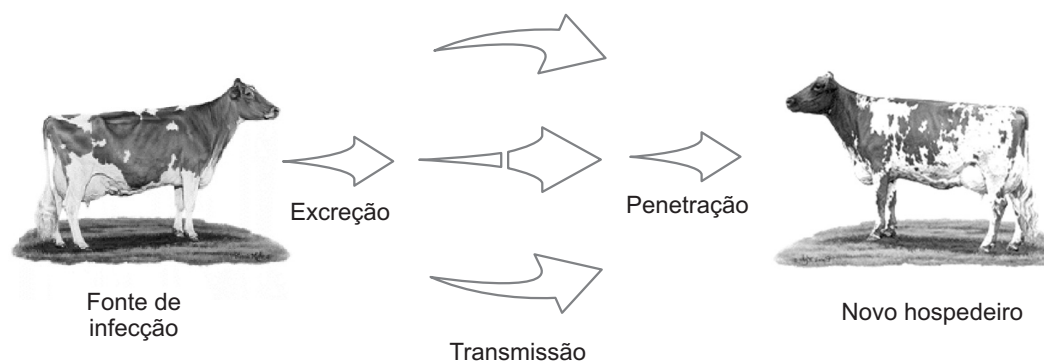


Figura 10.1. A cadeia do processo infeccioso.

Inicialmente, o agente deve penetrar e se multiplicar no hospedeiro e, mesmo na presença da resposta imunológica, produzir progênie viável. Essa progênie deve ser excretada do hospedeiro a tempo, pela via adequada e em quantidade suficiente para permitir a sua transmissão a outros indivíduos (Figura 10.2). Após a excreção, o agente deve ser capaz de resistir no meio ambiente o tempo necessário para encontrar outro hospedeiro susceptível.

A transmissão dos vírus entre hospedeiros pode ocorrer por diferentes meios. Alguns vírus são transmitidos por contato direto entre hospedeiros. Nesses casos, a capacidade do vírus resistir em condições ambientais é irrelevante, pois o tempo e espaço entre os hospedeiros são virtuais. Já outros agentes não são transferidos imediatamente, e a sua transferência entre hospedeiros ocorre com o auxílio de objetos inanimados ou de artrópodes (insetos). Nesses casos, o agente necessita obrigatoriamente resistir no meio ambiente e/ou replicar ou persistir viável nos vetores pelo tempo necessário, a fim de assegurar a sua transmissão ao próximo hospedeiro.

Ao contrário de outros microorganismos (bactérias e fungos) a maioria dos vírus não é capaz de manter a viabilidade por longos períodos no meio externo. Isso é crítico para muitos desses agentes, uma vez que a viabilidade e a perspectiva de transmissão são freqüentemente perdidas pela inativação no meio ambiente. Após encontrar um hospedeiro susceptível, o agente deve penetrar pela via adequada (Figura 10.3) e multiplicar nos tecidos e órgãos-alvo para produzir progênie e ser novamente excretado.

O cumprimento dessas etapas é fundamental para a perpetuação dos vírus – assim como de outros agentes infecciosos – na natureza. Na realidade, o processo evolutivo fez com que os agentes virais que existem atualmente tenham desenvolvido meios para cumprir essas etapas e, assim, sobreviver como espécie. Não obstante, as estratégias utilizadas para realizar essa tarefa são variadas e peculiares de cada vírus ou grupo de vírus. É também provável que, ao longo dos tempos, tenham surgido vírus que não foram capazes de cumprir alguma dessas etapas. Tais agentes certamente não tiveram sucesso em sua história natural e, conseqüentemente, desapareceram.

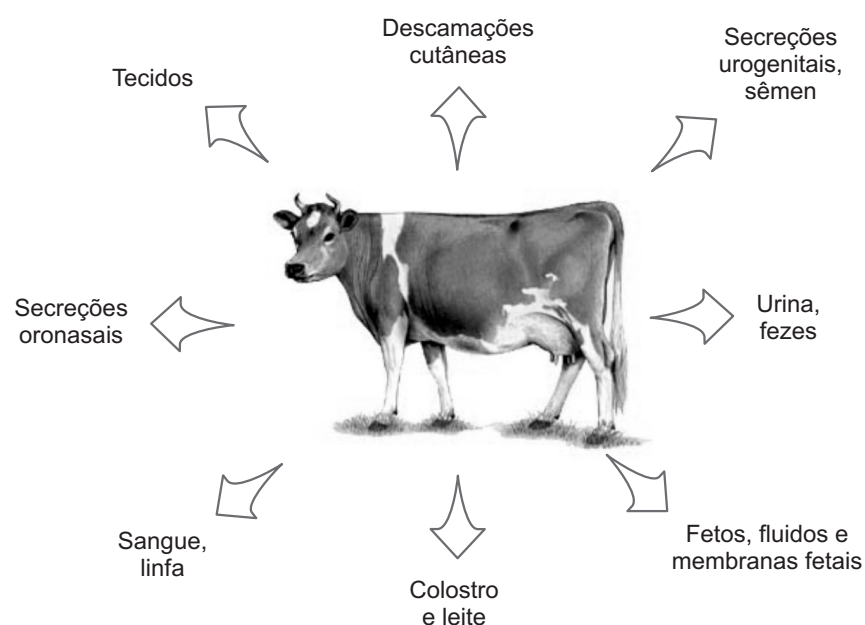


Figura 10.2. Vias de excreção de vírus que infectam animais.

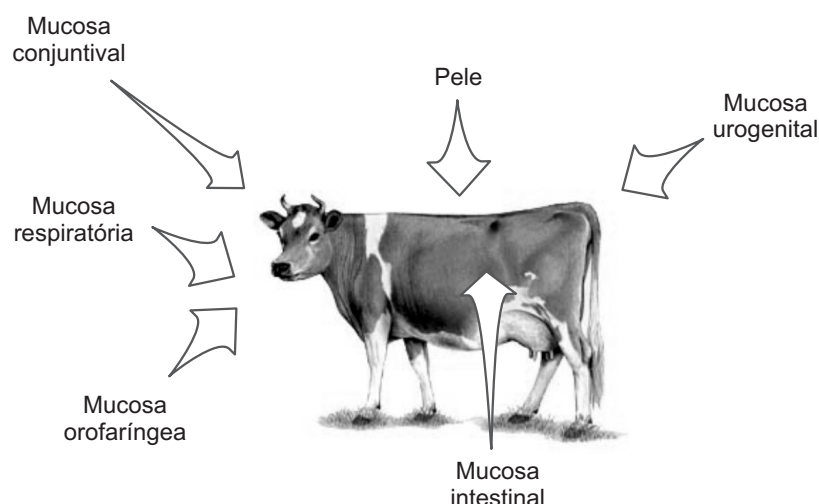


Figura 10.3. Vias de penetração de vírus que infectam animais.

2.1 Fontes de infecção

Define-se como *fonte de infecção* qualquer animal vertebrado que esteja infectado e seja capaz de transmitir o agente para outros animais susceptíveis. Excluem-se dessa definição os artrópodes, que, na maioria das infecções víricas animais, parecem desempenhar um papel predominantemente de transmissão e não de manutenção do agente. Dependendo do resultado das interações agente-hospedeiro, que podem ou não resultar em manifestações clínicas, as fontes de infecção (também chamados de hospedeiros) podem ser classificadas em *doentes* e *portadores*.

Os *doentes* são os animais infectados que manifestam sinais clínicos de doença. Do ponto de vista estritamente epidemiológico, essas fontes de infecção possuem uma importância relativamente menor, pois são facilmente reconhecidas como tal, o que permite o diagnóstico e a adoção das medidas de controle pertinentes. Alguns exemplos são os cães, com sinais clínicos de raiva, e os bovinos, com sinais característicos de febre aftosa. Não obstante, em infecções víricas, nas quais o desenvolvimento de doença é freqüente, os animais doentes se constituem nas fontes de infecção mais comuns e epidemiologicamente importantes.

Os *portadores* são os animais que abrigam e excretam o agente sem estar manifestando alterações clínicas indicativas de doença. Por isso não são facilmente reconhecíveis, o que os torna muito importantes na epidemiologia de cada infecção. Os animais portadores podem ser também denominados de *hospedeiros assintomáticos*. Dependendo da sua participação na disseminação viral, dois tipos de portadores podem ser reconhecidos: ativos e passivos. Os *portadores ativos* são aqueles que excretam o vírus; os *portadores passivos* apenas abrigam e replicam o agente sem excretá-lo ou transmiti-lo. A grande maioria dos portadores de agentes virais enquadra-se na primeira categoria. Entretanto, cães adultos podem abrigar o vírus da cinomose (CDV) no sistema nervoso central (SNC) de forma persistente sem excretá-lo. Aparentemente, búfalos infectados pelo vírus da febre aftosa (FMDV) tornam-se portadores após a infecção aguda, mas parecem ser incapazes de transmiti-lo. Nesses casos, esses animais se constituem em portadores passivos.

Dependendo do período em que excretam o agente, os *portadores ativos* podem ser classificados em *permanentes* ou *temporários*. Os *portadores ativos permanentes* são aqueles que excretam o vírus continuamente. Alguns exemplos são os animais infectados por retrovírus e aqueles persis-

tentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Os *portadores ativos temporários* excretam o agente – sem manifestar sinais clínicos concomitantes – por determinados períodos.

Quando a excreção viral inicia-se no período de incubação ou na fase prodrômica e os animais ainda não apresentam sinais clínicos, eles são chamados de *portadores em período de incubação* e *portadores prodrômicos*, respectivamente. Exemplos incluem os bovinos infectados com vírus respiratórios, que podem iniciar a excretar o vírus de um a três dias antes do início dos sinais clínicos. Em outras infecções, os animais podem seguir excretando o vírus após a resolução da doença clínica, sendo, então, denominados *portadores em fase de convalescença*. Suínos infectados pelo vírus da síndrome respiratória e reprodutiva (PRRSV) e cães infectados pelo adenovírus canino (CAV) enquadram-se nessa categoria, pois podem permanecer excretando o vírus por semanas ou até meses após o término dos sinais clínicos. Nesses casos, a excreção viral pode ocorrer durante períodos em que o animal não exibe sinais clínicos, o que caracteriza a condição de portador. *Portadores ativos temporários intermitentes* (ou esporádicos) excretam o vírus apenas esporadicamente, por poucas horas ou dias, a intervalos variáveis. São característicos das infecções latentes por alfavírus, cujas reativações periódicas resultam em excreção viral transitória, geralmente desacompanhada de manifestações clínicas.

Animais portadores podem permanecer por longo tempo na população excretando o vírus e contribuindo para a perpetuação do agente no rebanho. Várias infecções víricas somente conseguem se manter na natureza graças à existência de portadores, nos quais o agente encontra condições de se multiplicar continuamente. O reconhecimento e isolamento e/ou eliminação desses portadores constituem-se nos pontos-chave do combate a essas infecções.

Outro conceito importante em epidemiologia é o de *reservatório*. Denomina-se *reservatório* a espécie animal que abriga e mantém agentes infecciosos em um ecossistema, podendo transmiti-los para outras espécies. Embora utilizada, na

maioria das vezes, para designar espécies silvestres, essa denominação pode também ser utilizada para designar animais domésticos que sirvam de fontes de infecção e, como tal, mantenham e transmitam agentes infecciosos. Geralmente, as principais espécies que servem de reservatórios de agentes virais na natureza são as espécies de origem desses agentes, também chamadas de *hospedeiros* ou *reservatórios naturais*. No entanto, mesmo espécies que não se constituam nos hospedeiros naturais de determinados vírus podem, ocasionalmente, servir de reservatórios. Deve ser enfatizado que algumas espécies que abrigam agentes virais na natureza – e que se constituem, portanto, em reservatórios – desenvolvem a enfermidade devido à infecção. Nesse sentido, os agentes que conseguem infectar e se manter em espécies animais sem causar doença apresentam uma grande vantagem, pois possuem uma maior probabilidade de perpetuação e transmissão. Exemplos de espécies reservatórios são as aves aquáticas e migratórias, para os vírus da influenza A; pássaros e outras aves, para os alfavírus; roedores silvestres, para os arenavírus e hantavírus; morcegos de várias espécies, para diversos vírus (Nipah, Hendra, vírus da raiva).

Os morcegos hematófagos e carnívoros silvestres (raposas, cães silvestres, *raccons*) são reservatórios do vírus da raiva e podem transmiti-lo a várias espécies silvestres e domésticas (Figura 10.4). Os pássaros e outras aves silvestres são reservatórios do vírus do Nilo Ocidental (WNV) e dos vírus das encefalites do leste (EEEV) e oeste (WEEV) e podem transmiti-los para equinos, aves domésticas (faisões, emas) e, ocasionalmente, para humanos (Figura 10.5). Suídeos silvestres (*warthogs*) são reservatórios do vírus da peste suína africana (ASFV) e podem transmiti-lo para suínos domésticos. Nesses exemplos, independentemente se as espécies mencionadas constituem-se nos hospedeiros naturais do agente – e em alguns casos parecem sê-lo –, na prática, desempenham o papel de reservatórios, pois abrigam e transmitem o agente para outras espécies de interesse. O termo *reservatório*, portanto, teria uma definição mais funcional do que ecológica.

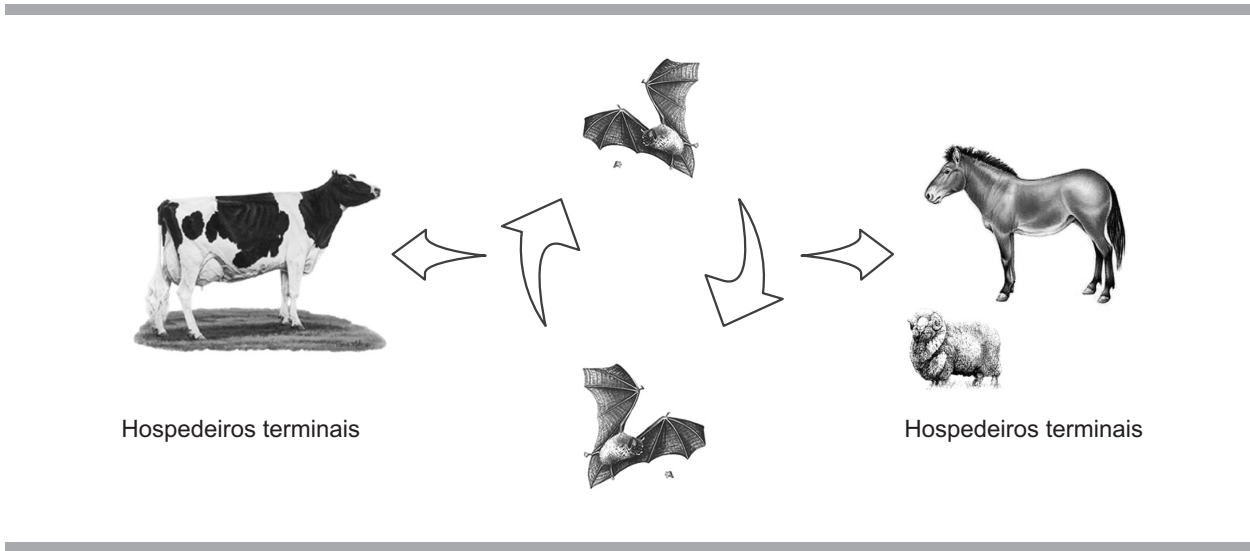


Figura 10.4. Ciclo natural da raiva de herbívoros.

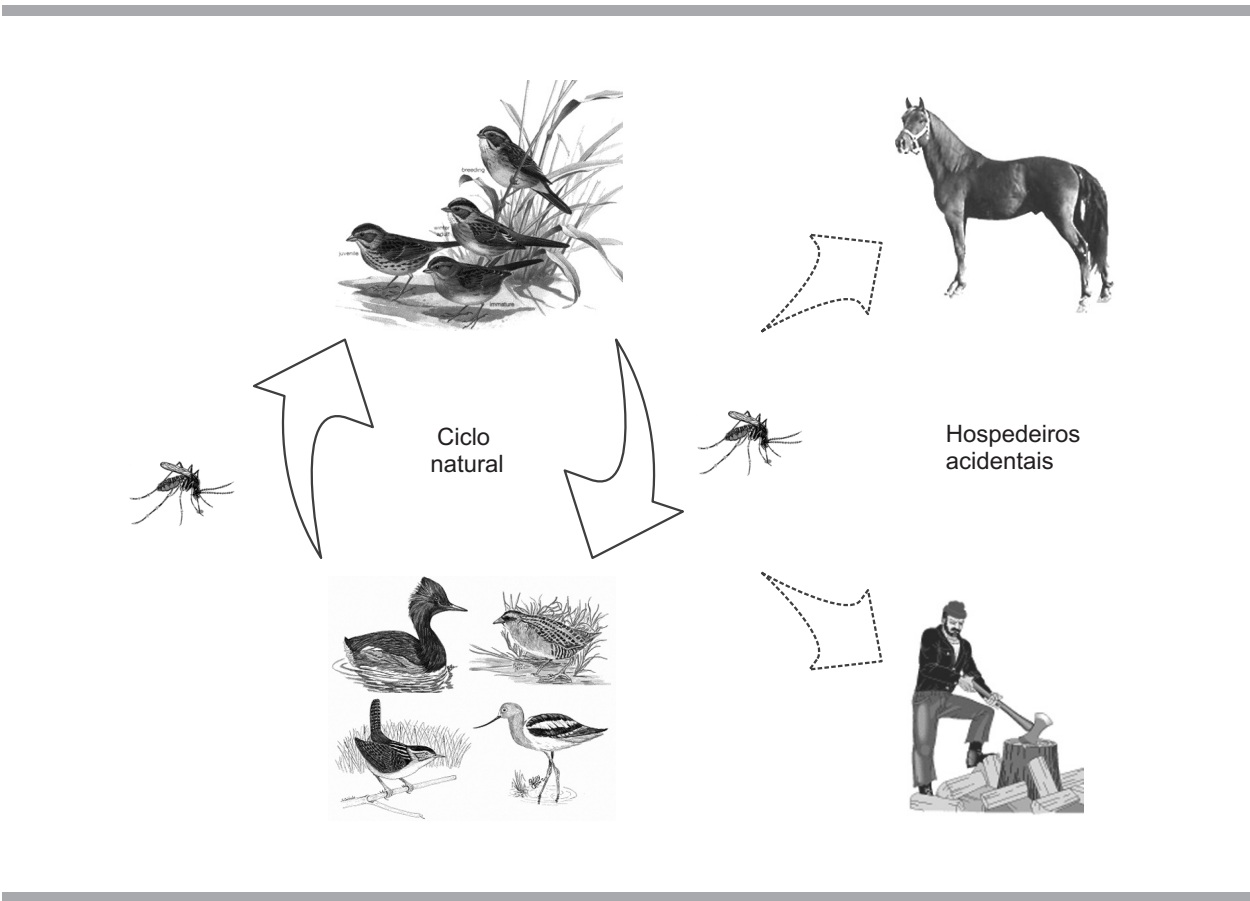


Figura 10.5. Ciclo natural dos vírus da encefalites eqüina do leste (EEEV), oeste (WEEV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV) e infecção de hospedeiros acidentais.

Espécies domésticas que mantenham um agente e o transmitam a outras espécies também podem ser consideradas reservatórios. A raiva pode ser mantida na população de cães urbanos e, ocasionalmente, ser transmitida para pessoas. Nesse caso, os cães seriam os reservatórios para a população humana. Espécies domésticas também podem servir de reservatórios de agentes virais e transmiti-los a animais silvestres. Surtos com alta mortalidade de mamíferos marinhos (focas, leões marinhos e cetáceos) associados a um morbilivírus (provavelmente o vírus da cinomose – CDV) foram relatados nos mares Mediterrâneo e Cáspio. O CDV, provavelmente transmitido por cães domésticos, também foi associado com doença e mortalidade de leões e hienas em uma reserva na Tanzânia e com doença em mãos-pelada (*racoons*) e gatos nos Estados Unidos (Figura 10.6). Na África do Sul, a raiva é mantida principalmente em cães domésticos urbanos ou rurais e, ocasionalmente, é transmitida a carnívoros selvagens (chacais), nos quais pode se manter por algum tempo.

O termo *hospedeiro terminal* (*dead end host*) é utilizado para designar indivíduos de uma espécie que são infectados esporadicamente (ou acidentalmente) por um agente, mas não possuem participação relevante no seu ciclo de transmissão

e manutenção na natureza. Por isso, obviamente, não podem se constituir em seus hospedeiros naturais. As razões pelas quais essas espécies não participam da cadeia de transmissão podem ser várias, incluindo o desenvolvimento de enfermidade rápida e fatal (não haveria tempo para uma excreção e transmissão significativa), a produção de níveis baixos de viremia (insuficientes para assegurar a transmissão) e incapacidade de transmitir o agente (pela razão anterior ou pela natureza da transmissão). O termo *terminal* se refere ao final da cadeia de transmissão e não necessariamente ao curso da enfermidade. Os bovinos, gatos e cães podem ser ocasionalmente infectados pelo vírus da doença de Aujeszky (PRV), mas não possuem papel importante na transmissão, devido ao curso rápido e fatal da doença. Situação semelhante ocorre com a raiva nessas espécies e também em humanos. Mesmo na hipótese de a raiva bovina não possuir curso rápido e fatal, dificilmente seria transmitida por essas espécies, devido à forma de transmissão (bovinos não possuem o hábito de morder outros animais). Os humanos, eqüinos e outras espécies domésticas são freqüentemente infectados pelo WNV, EEEV e WEEV, mas não possuem papel importante na transmissão. Nesses casos, os níveis e duração da viremia são geralmente incompatíveis com a

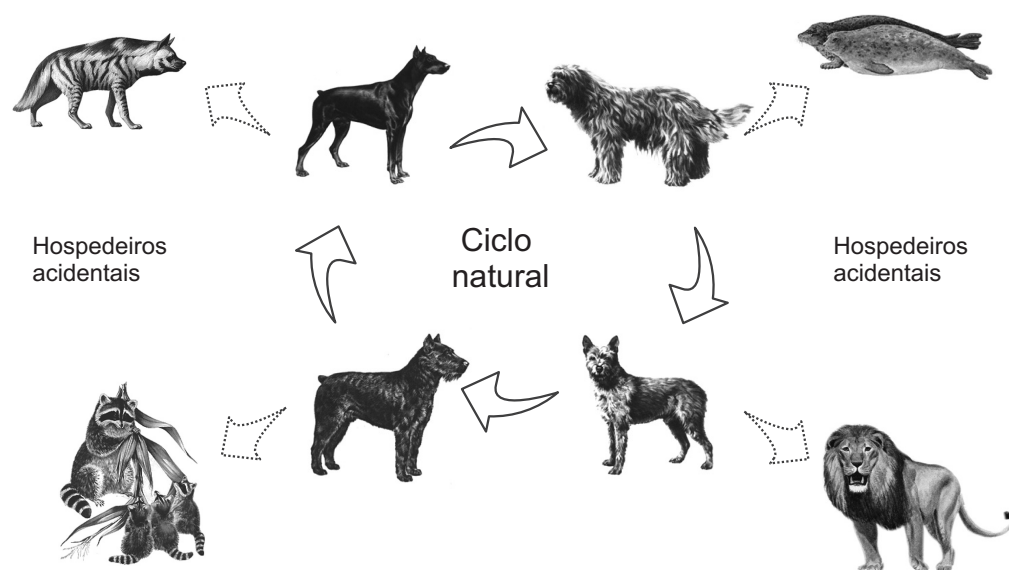


Figura 10.6. Ciclo natural do vírus da cinomose e transmissão acidental para espécies de vida livre.

transmissão por mosquitos. Em alguns desses casos, a infecção também é rápida e fatal, o que dificulta a transmissão do agente a partir do animal infectado. Casos de transmissão do WNV entre pessoas, por transfusão sanguínea, via placenta e pela amamentação já foram relatados, mas representam exceções e possuem importância epidemiológica restrita. Pessoas infectadas pelos hantavírus também não participam ativamente na transmissão do agente. Acredita-se que as espécies em que um determinado vírus cause doença severa e mortalidade considerável não se constituam em seus hospedeiros naturais, e sim acidentais. A tendência é que os vírus não causem doença severa em seus hospedeiros naturais devido a um processo evolutivo que, eventualmente, tenha resultado em um equilíbrio na interação

agente-hospedeiro, ou seja, o desenvolvimento de doença severa nos hospedeiros desfavoreceria a manutenção desses agentes na natureza.

2.2 Vias de excreção

Para que ocorra a transmissão entre indivíduos, o vírus deve ser inicialmente excretado do hospedeiro infectado pela via adequada em quantidade suficiente. As vias pela qual o agente é excretado do organismo animal são denominadas *vias de excreção* (vias de eliminação) ou *portas de saída*. A via de excreção de um vírus é determinada primariamente pelo seu tropismo, ou seja, pelo tecido ou órgão-alvo onde ocorre a sua replicação. Por exemplo, os vírus que replicam na mucosa das vias respiratórias são excretados pe-

Tabela 10.1. Vias de excreção dos principais vírus de animais

Vias de excreção	Tipos de vírus/infecção	Exemplos
Secreções oronasais e expectorações	vírus respiratórios	vírus da influenza, parainfluenza, rinovírus, herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)
	vírus que replicam na cavidade oral e anexos	CDV, vírus da febre aftosa (FMDV), vírus da raiva
Fezes	vírus entéricos	enterovírus, coronavírus, parvovírus canino (CPV)
	vírus hepáticos	vírus das hepatites
Urina	vírus que replicam nos epitélios dos túbulos renais	arenavírus, hantavírus
	vírus que replicam no epitélio vesical	CDV
	outros vírus sistêmicos	
Sêmen e/ou secreções genitais	vírus que replicam nas gônadas	PRRSV
	vírus que replicam no trato genital externo	PRRSV, BoHV-1, vírus do exantema coital eqüino (EHV-3)
	vírus sistêmicos	vírus da leucose bovina (BLV), outros retrovírus
Fetos/membranas e fluidos fetais	vírus que infectam o feto	BVDV, BoHV-1, parvovírus suíno (PPV), PRRSV
	vírus sistêmicos	
Sangue e linfa	vírus sistêmicos ou vírus que produzem viremia permanente ou transitória	retrovírus, BVDV, flavivírus, vírus da língua azul (BTV), etc.
Pele, descamações e exsudações cutâneas	vírus que replicam em camadas superficiais da pele ou na transição pele-mucosa	poxvírus, vírus do ectima contagioso, papilomavírus, FMDV, BoHV-2

las secreções oro-nasais e expectorações; os vírus que replicam no fígado e no trato intestinal são excretados pelas fezes.

As principais vias de excreção de agentes virais estão ilustradas na Figura 10.2, e os agentes que as utilizam estão apresentados na Tabela 10.1. A grande maioria dos vírus pode ser excretada por mais de uma via, embora geralmente uma delas apresente maior importância em determinadas situações.

A via de excreção também determina a forma de transmissão. Os vírus que são excretados no sêmen serão transmitidos pela cópula ou pela inseminação artificial; os vírus que são excretados nas fezes provavelmente serão transmitidos pela via fecal-oral, pela contaminação de água e alimentos. Os vírus presentes no sangue e/ou na linfa provavelmente serão transmitidos por vetores ou por procedimentos iatrogênicos (agulhas e material cirúrgico contaminado).

2.3 Mecanismos de transmissão

A transferência ou transmissão do agente entre indivíduos representa o ponto-chave na cadeia do processo infeccioso. O agente excretado deve ser capaz de resistir no meio ambiente o tempo necessário para encontrar e penetrar

em outro hospedeiro susceptível. No entanto, ao contrário de outros microorganismos que conseguem sobreviver no meio ambiente por longos períodos, a viabilidade da maioria dos vírus fora do organismo do hospedeiro é muito limitada. Por isso, certamente, grande parte das partículas virais produzidas pelas infecções virais é inativada no meio ambiente antes de ter conseguido alcançar um novo hospedeiro.

As principais formas de transmissão dos agentes virais estão apresentadas na Figura 10.7 e Tabela 10.2. Em termos gerais, a transmissão dos vírus entre indivíduos pode ser *horizontal* ou *vertical*. *Transmissão horizontal* se refere à transmissão entre indivíduos de uma mesma geração, pela coabitação de um mesmo *habitat*. *Transmissão vertical* refere-se à transmissão do agente de um hospedeiro para os seus descendentes. A transmissão horizontal pode ser direta ou indireta. A transmissão horizontal direta pode ocorrer por *contato direto* ou *indireto*. A transmissão indireta pode ocorrer com a participação de veículos, por vetores ou pelo ar.

A transmissão direta por *contato direto* ocorre pelo contato físico entre o hospedeiro infectado e o novo hospedeiro. O contato entre mucosas, entre pele e mucosa ou entre pele e pele permite ao agente passar diretamente ao animal susceptível

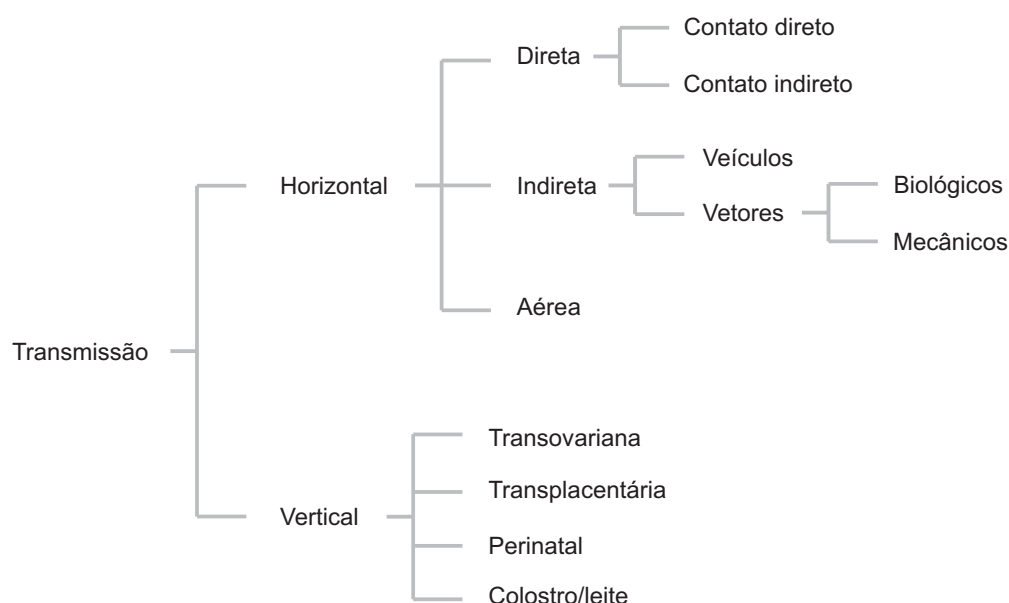


Figura 10.7. Formas de transmissão dos vírus de animais.

e pode ocorrer por mordedura (transmissão do vírus da raiva, arenavírus entre roedores), lambedura (vírus entéricos), contato focinho-focinho (virose respiratórias, FMDV, CDV), focinho-genitália (herpesvírus bovino tipo 1 [BoHV-1],

BVDV), focinho-pele (vírus da mamilitite herpética [BoHV-2]), contato pele-pele (poxvírus, papilomavírus) e pela cópula (BoHV-1, vírus do exantema coital dos eqüinos [EHV-3], PRRSV). Nessas formas de transmissão, o agente é trans-

Tabela 10.2. Principais mecanismos de transmissão dos vírus de animais

Família	Mecanismo de transmissão
<i>Parvoviridae</i>	Contato direto e indireto (fecal-oral, respiratória), transplacentária (vírus da panleucopenia felina, parvovírus suíno).
<i>Circoviridae</i>	Contato direto e indireto (fecal-oral, respiratória).
<i>Papillomaviridae</i>	Contato direto e indireto (cutânea, lesões de pele).
<i>Adenoviridae</i>	Contato direto e indireto (fecal-oral, respiratória).
<i>Poxviridae</i>	Contato direto ou indireto (cutânea [orf, cowpox], respiratória [sheep pox]), vetores artrópodes (vírus do mixoma).
<i>Herpesviridae</i>	Contato direto ou indireto (sexual [exantema coital eqüino [EHV-3], balanopostite e vulvovaginite pelo BoHV-1], respiratória (BoHV-1), transplacentária (PRV, BoHV-1).
<i>Asfarviridae</i>	Contato direto ou indireto (respiratória), indireto por vetores (carrapatos), oral (alimento contaminado).
<i>Picornaviridae</i>	Contato direto ou indireto (fecal-oral [enterovírus, FMDV], respiratória [rinovírus, FMDV]), transmissão indireta por veículos (alimentos contaminados, fômites [FMDV]).
<i>Caliciviridae</i>	Contato direto ou indireto (fecal-oral, respiratória).
<i>Arteriviridae</i>	Contato direto ou indireto (respiratória, sexual), indireto (fômites, sêmen contaminado [PRRSV, EAV]).
<i>Togaviridae</i>	Indireta por vetores.
<i>Flaviviridae</i>	Indireta por vetores (WNV), contato direto e indireto (fecal-oral, respiratória [BVDV, vírus da peste suína clássica [CSFV]), transplacentária (BVDV).
<i>Coronaviridae</i>	Contato direto ou indireto (fecal-oral, respiratória)
<i>Arenaviridae</i>	Contato direto ou indireto (urina contaminada, mordeduras, respiratória)
<i>Bunyaviridae</i>	Indireta por vetores (vírus da febre do Vale Rift)
<i>Orthomyxoviridae</i>	Contato direto ou indireto (respiratória)
<i>Rhabdoviridae</i>	Contato direto (mordedura [vírus da raiva]), direto ou indireto (vírus da estomatite vesicular [VSV]), indireta por vetores (VSV).
<i>Paramyxoviridae</i>	Contato direto ou indireto (respiratória).
<i>Reoviridae</i>	Contato direto ou indireto (fecal-oral [rotavírus, vírus da gastroenterite transmissível dos suínos [TGEV]), indireta por vetores (BTV).
<i>Retroviridae</i>	Contato direto ou indireto, vertical (<i>in ovo</i> [leucose aviária] ou transplacentária [BLV]), ingestão, indireta por vetores (EIAV).

ferido imediatamente a outro hospedeiro, assim, a sua capacidade de resistência no meio ambiente é pouco relevante para o sucesso da transmissão.

Na transmissão direta por *contato indireto* não ocorre contato físico entre o corpo do animal infectado e o novo hospedeiro. Nesses casos, ocorre o contato imediato entre o material contaminado recém-excretado (secreções, excreções, líquido ou membranas fetais) e uma superfície mucosa (focinho, mucosa nasal, oral e genitália) ou pele do novo hospedeiro. A diferença entre essa forma de transmissão e a *transmissão indireta por veículos*, descrita a seguir, é muito tênue e de difícil percepção em alguns casos.

A *transmissão indireta* envolve a transmissão do agente por meio de objetos inanimados (denominados veículos ou fômites) ou por vetores invertebrados (insetos). Veículos ou fômites, frequentemente envolvidos na transmissão de vírus animais, incluem agulhas hipodérmicas, material cirúrgico, luvas de palpação retal, espéculos, formigas, focinheira, tatuadores, aplicadores de brinco, roupas e utensílios, instalações, equipamentos (ordenhadeiras), cochos, solo e outros. A água, leite, sêmen, subprodutos cárneos e outros alimentos contaminados com o agente também podem servir de veículos para a transmissão de agentes virais. No caso de transmissão por veículos, o sucesso da transmissão depende da capacidade de o agente preservar a sua viabilidade no meio ambiente o tempo suficiente para alcançar o novo hospedeiro.

A transmissão de vírus por luvas de palpação, espéculos contaminados ou equipamento de inseminação artificial também pode ocorrer (vírus da leucose bovina [BLV], BVDV, PRRSV). Virose respiratórias (BoHV-1, BVDV, vírus respiratório sincicial bovino [BRSV], vírus da parainfluenza tipo 3 [bPI3v]) ou cutâneas (FMDV, poxvírus, BoHV-2) podem ser transmitidas pelo contato de mucosas com cochos contaminados; viroses entéricas e hepáticas podem ser transmitidas pela via oro-fecal através da contaminação de cochos, água e alimentos. O sêmen utilizado em inseminação artificial pode servir de veículo para vários vírus (BoHV-1, PRRSV, vírus da língua azul [BTV], BVDV, PRV). O sangue contaminado, utilizado em transfusões e/ou outros

procedimentos, pode transmitir agentes como o VLB, vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), entre outros.

A possibilidade de transmissão por veículos é maior para os vírus que possuem grande capacidade de resistência no meio ambiente. O FMDV é um exemplo de agente que possui grande capacidade de disseminação por meio de veículos (sapatos, roupas, utensílios, alimentos etc.). A transmissão por aerossóis a curtas distâncias pode ocorrer para os vírus que replicam na cavidade oronasal e anexos (vírus da influenza, vírus da bronquite infecciosa das aves [IBV], vírus da laringotraqueíte infecciosa [ILTV], BoHV-1, CDV, vírus da Doença de Newcastle [NDV]).

O termo *iatrogênico* se refere à transmissão de agentes por procedimentos médicos e/ou relacionados com a saúde animal. Os retrovírus animais (BLV, EIAV, vírus da imunodeficiência felina [FIV]), além de outros vírus que produzem viremia (BVDV, BTV) podem ser transmitidos por agulhas, material cirúrgico ou outros equipamentos contaminados (p. ex.: tatuadores, aplicadores de brinco). Vários vírus sistêmicos podem ser transmitidos por transfusão de sangue ou derivados e também por transplante de órgãos.

Vários vírus animais são transmitidos pela picada de artrópodes (insetos), denominados genericamente *vetores*. Dependendo de sua participação na transmissão, os vetores artrópodes podem ser classificados em vetores *biológicos* e *mecânicos*. Na maioria dos casos, os insetos possuem um papel mais amplo do que simplesmente transferir o agente entre hospedeiros, ou seja, são susceptíveis à replicação e amplificação do vírus em seus tecidos, eventos que ocorrem após a sua contaminação e que são necessários para que ocorra a subsequente transmissão a outro hospedeiro. Por isso são chamados de *vetores biológicos*. Exemplos de vírus transmitidos primariamente por mosquitos são os vírus das encefalites equinas (EEEV, WEEV e vírus da encefalite venezuelana [VEEV]), o WNV, o vírus da dengue e febre amarela (YFV), além de vários bunivírus. Os culicídeos transmitem o BTV, carrapatos transmitem o ASFV, entre outros. Os vírus transmitidos primariamente por insetos são chamados genericamente de arbovírus (*arthropod-borne viruses*).

Além dos arbovírus, outros agentes virais podem ocasionalmente ser transmitidos por essa via. Nesses casos, a transmissão por insetos é apenas uma das formas de transmissão – geralmente não a principal – e, por isso, possui importância epidemiológica limitada (p. ex.: BLV).

Alguns vírus podem ser transmitidos por insetos, de forma mecânica, pela simples contaminação de partes de seu corpo (probóscide, asas) (p. ex.: vírus da mixomatose, poxvírus, BLV, BoHV-2). Por outro lado, os tabanídeos e as moscas do estábulo transmitem mecanicamente o EIAV, e esta é a principal forma de transmissão do vírus. Transmissão mecânica por alguns insetos também pode ocorrer no ciclo natural do VEEV. Nesta infecção, no entanto, os insetos desempenham preponderantemente o papel de vetores biológicos. No caso de transmissão mecânica, os vetores não são susceptíveis à replicação do agente, desempenhando apenas um papel mecânico na transferência do agente entre hospedeiros. Por isso são denominados *vetores mecânicos*. Pela analogia de função, os vetores mecânicos são ocasionalmente referidos como “agulhas voadoras”.

A *transmissão aérea* pelo transporte de gotículas e/ou partículas contaminadas a longas distâncias tem sido demonstrada em algumas viroses. Gotículas em aerossóis (ou partículas dessecadas) podem ser resultado de espirro e/ou tosse em viroses respiratórias (influenza) ou de aerossolização/dessecação de urina (hantavírus) ou fezes (enterovírus). Essa forma de transmissão somente é possível para os agentes que apresentem grande resistência no meio ambiente. Já foi demonstrado que o FMDV pode se disseminar por vários quilômetros, dependendo das condições de umidade do ar e ventos. No entanto, sabe-se que a maioria dos vírus, principalmente os respiratórios, só se dissemina pelo ar a pequenas distâncias. A infecção por hantavírus em humanos ocorre frequentemente pela inalação e/ou deposição conjuntival de partículas de poeira oriundas de solo contaminado pela urina de roedores portadores. Os poxvírus, por causa de sua grande resistência ambiental, também podem ser transmitidos por via aérea.

A *transmissão vertical* de um vírus pode ocorrer de várias formas (Figura 10.7). Certos retroví-

rus aviários e murinos são capazes de integrar o seu genoma no cromossomos dos gametas (vírus da leucose aviária [ALV], retrovírus murinos). Esse tipo de transmissão é denominada *transovariana*. Essa forma de transmissão também ocorre com alguns vírus nos vetores artrópodes (p. ex.: a fêmea do mosquito *Aedes aegypti* transmite o vírus da dengue aos ovos e larvas; esse tipo de transmissão também ocorre com o ASFV em carapatos). Outros vírus são transmitidos através da placenta (*transmissão transplacentária*), resultando em infecção fetal com conseqüências diversas (BVDV, BLV, PRRSV, parvovírus suíno [PPV], entre outros). A transmissão que ocorre nas proximidades e/ou durante o parto é denominada de *perinatal* (herpesvírus canino [CHV], PRV, FIV). A transmissão pelo colostro e/ou leite contaminado (vírus da artrite-encefalite caprina [CAEV], *maedi-visna*, VLB) também é considerada uma forma de transmissão vertical se envolver mãe e filho.

A maioria dos vírus pode ser transmitida por mais de uma forma, embora geralmente uma delas desempenhe um papel epidemiológico mais importante em cada situação.

2.4 Vias de penetração

Após ser excretado e transportado (se for o caso), o vírus deve penetrar no novo hospedeiro pela via adequada para que possa estabelecer a infecção. Os sítios por onde os vírus penetram no hospedeiro são denominados *vias de penetração* (ou portas de entrada) (Figura 10.3). A via de penetração de um agente é determinada primariamente pelo mecanismo de transmissão. Assim, os vírus transmitidos por água e alimentos contaminados provavelmente irão penetrar pela via oral; os vírus transmitidos por vetores artrópodes irão penetrar através de orifícios (picadas) na pele; os vírus transmitidos pelo sêmen irão penetrar na mucosa genital feminina.

A maioria dos vírus pode utilizar mais de uma via de penetração, dependendo da via de excreção e do mecanismo de transmissão; poucos vírus utilizam uma única via de penetração. As principais vias de penetração de agentes virais nos seus hospedeiros são:

- mucosa respiratória: vírus respiratórios (vírus da influenza, rinovírus, BoHV-1, NDV);
- mucosa conjuntival: adenovírus, hantavírus, alguns herpesvírus;
- mucosa orofaríngea: CDV, FMDV, vírus sistêmicos;
- mucosa intestinal: enterovírus, coronavírus, rotavírus;
- pele: BoHV-2, poxvírus, papilomavírus, arbovírus (pela picada de insetos);
- mucosa genital: BoHV-1, PRRSV, EHV-3, além de agentes virais veiculados pelo sêmen.

2.5 O novo hospedeiro

A simples penetração do agente no organismo de um animal não assegura o desenvolvimento da infecção. Para que isso ocorra, o hospedeiro deve ser susceptível ao agente. O termo *susceptibilidade* refere-se ao conjunto de condições apresentadas pelo hospedeiro para permitir a multiplicação do vírus. O termo *resistência* refere-se ao conjunto de barreiras que o organismo oferece para impedir ou limitar a infecção. A susceptibilidade e resistência são características individuais e podem variar com vários fatores, tais como: espécie, raça, sexo, idade, exposição prévia ao agente, estado nutricional e fisiológico, entre outros. O termo *refratariedade*, por outro lado, refere-se a um grau absoluto de resistência, que é característico da espécie animal. Por exemplo, a espécie canina é naturalmente refratária ao vírus da imunodeficiência humana (HIV); assim como os eqüinos são refratários ao FMDV.

Os fatores que determinam a susceptibilidade (e resistência) de uma espécie animal a um determinado vírus são múltiplos e, em muitos casos, não são completamente conhecidos. Nesse sentido, deve-se fazer uma distinção entre *susceptibilidade natural* e *susceptibilidade experimental*. Algumas espécies não são naturalmente infectadas por um determinado agente, mas podem ser infectadas experimentalmente. Como exemplo, citam-se: a) os coelhos, que não são infectados naturalmente pelo BoHV-1 e BoHV-5, mas podem ser infectados experimentalmente, desenvolvendo a enfermidade; b) animais de laboratório (cobaias, coelhos, camundongos e ratos), que podem ser

infectados experimentalmente por uma variedade de vírus humanos e animais, embora a infecção natural por esses agentes nessas espécies não tenha sido descrita. Essa característica tem sido explorada para estudos de patogenia e outros aspectos da biologia desses agentes. É provável que a resistência à infecção natural (ou a ausência de casos de infecção natural) de algumas dessas espécies deva-se à falta de oportunidade de infecção mais do que à resistência propriamente dita, ou seja, é possível que algumas dessas espécies poderiam ser infectadas também *in vivo*, desde que providas as condições necessárias para tal (p. ex.: contato apropriado com animais que estejam excretando o vírus e penetração do agente pela via adequada).

2.5.1 Patogenia e resposta imunológica

Após a penetração no hospedeiro susceptível, o vírus deve replicar próximo ao local de entrada (geralmente nas células epiteliais e/ou no tecido linforreticular adjacente) para produzir progênie suficiente para ultrapassar as defesas do hospedeiro. Dependendo das interações entre o agente e o hospedeiro, a infecção pode ou não resultar em manifestações clínicas. Os mecanismos pelos quais os agentes infecciosos produzem doença em seus hospedeiros são considerados sob a denominação de *patogenia* ou *patogênese* (pato = doença, genesis = origem, formação). O conjunto de respostas do hospedeiro à infecção vírica (resistência natural e adquirida) é denominado genericamente de *resposta imunológica*. Os mecanismos gerais da patogenia e da resposta imunológica às infecções víricas foram tratados de forma geral nos Capítulos 8 e 9, respectivamente, e, especificamente, nos capítulos de cada família. Abaixo são relacionados alguns termos relacionados com a patogenia.

O *período de incubação* de uma infecção é o intervalo de tempo entre a penetração do agente e o início dos sinais clínicos. A sua duração varia de acordo com fatores do vírus (espécie, cepa, dose, virulência etc.) e do hospedeiro (espécie animal, condição nutricional e imunológica, via de inoculação etc.) e pode variar entre poucos dias (febre aftosa, influenza), meses, até anos (leucose bovi-

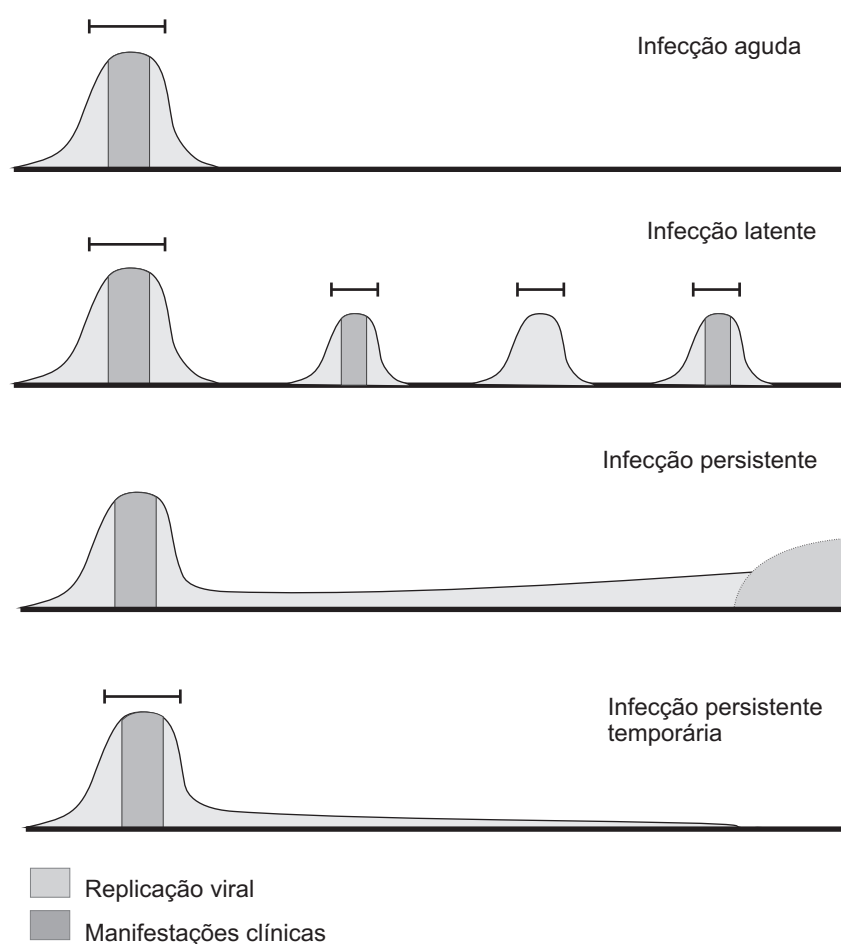
na). Quando a infecção for subclínica, o período de incubação pode ser infinito.

O *período pré-patente* é o intervalo de tempo entre a penetração do agente e o início da excreção viral pelo hospedeiro. Depende principalmente da duração do ciclo replicativo do vírus e pode ser de horas, poucos dias (vírus respiratórios, FMDV) até semanas ou meses (alguns gamaherpesvírus). O período *patente*, também chamado de período de *transmissibilidade* ou *comunicabilidade* é a fase da infecção em que o agente é excretado e, portanto, pode ser transmitido. Em infecções agudas clínicas, a duração da excreção do vírus coincide razoavelmente com o período clínico, podendo iniciar horas ou poucos dias antes e estender-se por algumas horas ou alguns dias

após. Em infecções persistentes por retrovírus, o agente pode ser excretado por um longo período (até anos) antes do aparecimento de sinais clínicos. Em outras infecções (PRRSV, ILTV, vírus da arterite eqüina [EVAV], CAV, alguns coronavírus), os hospedeiros podem continuar excretando o vírus por longo períodos após o término das manifestações clínicas (Figura 10.8).

3 Mecanismos de manutenção dos vírus na natureza

A sobrevivência dos vírus na natureza depende da sua capacidade de cumprir sequencialmente as etapas da cadeia do processo infeccioso. A incapacidade da maioria dos vírus de resistir



Fonte: adaptado de Flint et al. (2000).

Figura 10.8. Padrões de ocorrência das infecções e período de transmissibilidade em diferentes tipos de infecções virais.

por longo tempo no meio ambiente os obriga a utilizar diferentes estratégias para prolongar e perpetuar a sua existência. Infecções persistentes ou latentes, longos períodos de replicação e excreção, longos períodos de incubação, infecção de várias espécies animais e/ou de insetos, e transmissão aos descendentes (transmissão vertical) estão entre as estratégias utilizadas pelos vírus para se perpetuar na natureza. Não obstante, as partículas víricas de diversos vírus são relativamente estáveis, podendo persistir viáveis por períodos consideráveis no meio ambiente. Muitos vírus utilizam uma combinação de mais de uma dessas estratégias para conseguir se perpetuar na população. Outros vírus não utilizam nenhuma dessas estratégias e só conseguem se manter na natureza por meio de infecções agudas sucessivas.

3.1 Infecções persistentes

As infecções persistentes, acompanhadas ou não de manifestações clínicas, constituem-se em importantes meios de manutenção de vários agentes virais na natureza. Durante o período de infecção – que pode durar toda a vida do animal – o vírus fica disponível no organismo do animal e pode ser excretado de forma contínua ou intermitente, podendo infectar outros animais e, assim, alimentar a cadeia do processo infeccioso (Figuras 10.8 e 10.9). Alguns vírus são excretados

– ou ficam disponíveis no organismo para serem transmitidos – continuamente a partir do final do período pré-patente. Exemplos são as infecções pelos retrovírus animais, pelo BTV, papilomavírus (persistem nas lesões) e calicivírus felino (FeCV). Bezerros infectados intra-uterinamente pelo BVDV podem nascer portadores e excretar o vírus por toda a vida. Outros vírus podem ser excretados por longos períodos após a infecção aguda (PRRSV, EVAV, CAV, alguns coronavírus). Por outro lado, alguns tipos de persistência apresentam um papel pouco relevante do ponto de vista epidemiológico, pois o vírus não é excretado. Por exemplo, a infecção persistente pelo CDV no SNC de cães adultos geralmente não é acompanhada de excreção viral. Da mesma forma, alguns bovinos previamente imunizados contra o FMDV e posteriormente infectados, assim como bubalinos infectados pelo FMDV, podem ficar portadores do vírus após a infecção primária, embora a sua capacidade de transmitir o agente para outros hospedeiros ainda seja questionável.

3.2 Infecções latentes

Animais infectados pelos alfa herpesvírus (BoHV-1, BoHV-5, PRV, EHV-1), entre outros, excretam o agente por alguns dias durante a infecção aguda, mas a replicação viral eventualmente cessa devido à resposta imunológica

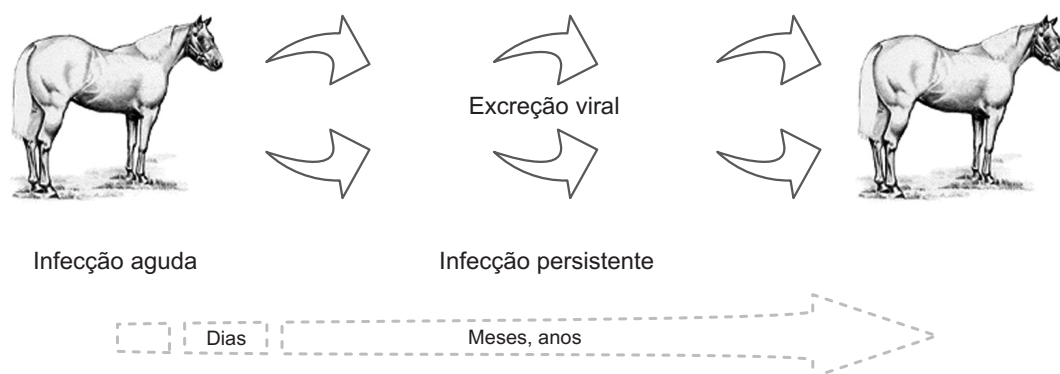


Figura 10.9. Infecções persistentes de vírus de animais: vírus da anemia infecciosa equina (EIAV).

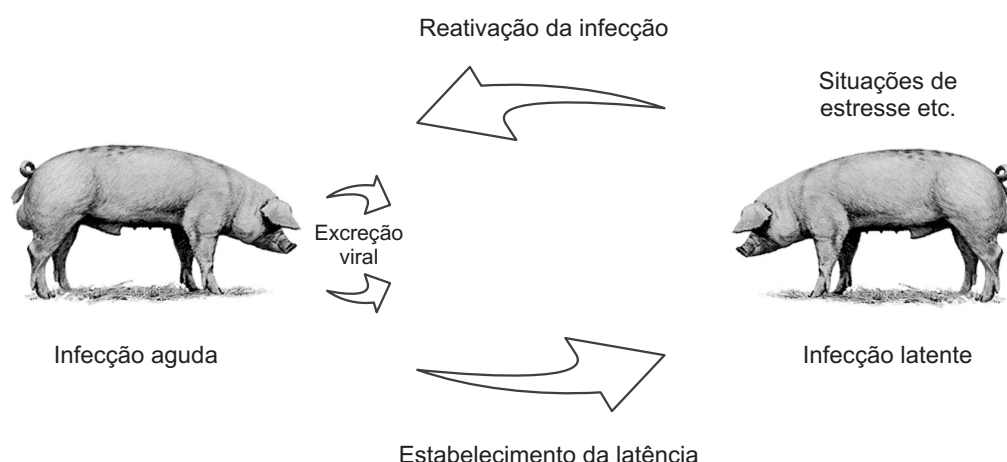


Figura 10.10. Infecções latentes de vírus animais: vírus da doença de Aujeszky (PRV).

do hospedeiro. Esses animais, no entanto, ficam portadores do agente na forma latente para o resto da vida. A infecção latente se caracteriza pela presença do genoma viral inativo, principalmente em neurônios de gânglios nervosos, sem a expressão de proteínas e/ou produção de partículas virais. Esporadicamente, a infecção latente pode ser reativada por situações de estresse, resultando em replicação e excreção viral (Figura 10.10). O vírus excretado durante os eventos de reativação pode, então, ser transmitido a outros animais. Os episódios de reativação e excreção podem se repetir periódica e indefinidamente durante a vida do animal, proporcionando inúmeras ocasiões para a transmissão do agente. Assim, as infecções latentes e suas reativações periódicas se constituem em meios eficientes de perpetuação e disseminação desses vírus na natureza e representam o principal obstáculo para o estabelecimento de medidas de combate contra essas infecções. Por isso, a capacidade de estabelecer infecções latentes possui um papel central e fundamental na epidemiologia das infecções pelos alfa herpesvírus.

3.3 Infecção de várias espécies animais

Ao contrário de alguns vírus que possuem um espectro de hospedeiros restrito (infectam uma única espécie animal), vários outros agentes virais podem infectar mais de uma espécie, o

que representa uma vantagem em sua estratégia de sobrevivência. Alguns exemplos clássicos são a maioria dos alfavírus (*Togaviridae*), alguns rabdovírus (vírus da estomatite vesicular, VSV) e flavivírus, que podem infectar uma variedade de espécies de aves e mamíferos (Figura 10.11). O vírus da influenza A, por meio de mutações/adaptações, também pode infectar várias espécies de aves domésticas e silvestres, além de mamíferos (Figura 10.12); o VSV pode infectar várias espécies de mamíferos. O WNV é capaz de infectar naturalmente mais de 180 espécies de vertebrados, incluindo pássaros e outras aves silvestres e domésticas (mais de 150 espécies) e mamíferos. A infecção alternada dessas espécies pode favorecer a permanência do agente no ecossistema. Além dos vírus que usualmente infectam mais de um hospedeiro como parte de seu ciclo natural, outros podem, ocasional ou acidentalmente, infectar outras espécies. Nesses casos, o hospedeiro acidental não participa da cadeia de transmissão do agente. A transmissão de vírus entre os reservatórios silvestres e destes para a espécie hospedeira principal pode ocorrer por vários mecanismos e, freqüentemente, envolve a participação de vetores artrópodes. Em geral, considera-se que quanto maior o espectro de hospedeiros suscetíveis, mais favorecida será a sobrevivência do agente na natureza. No entanto, isso não impede que vírus que infectem naturalmente apenas uma espécie – e os exemplos são numerosos – consi-

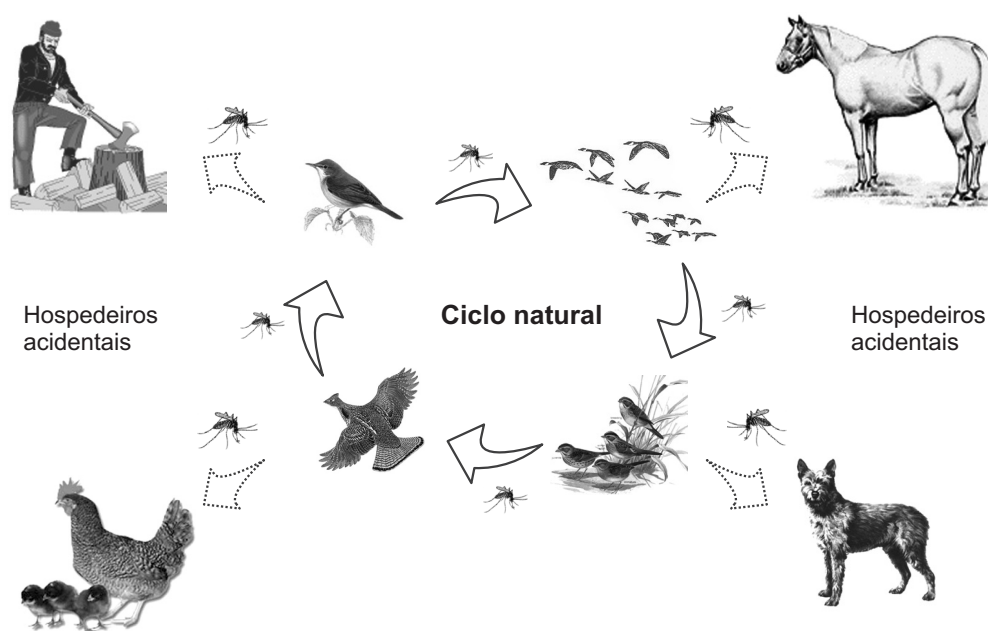
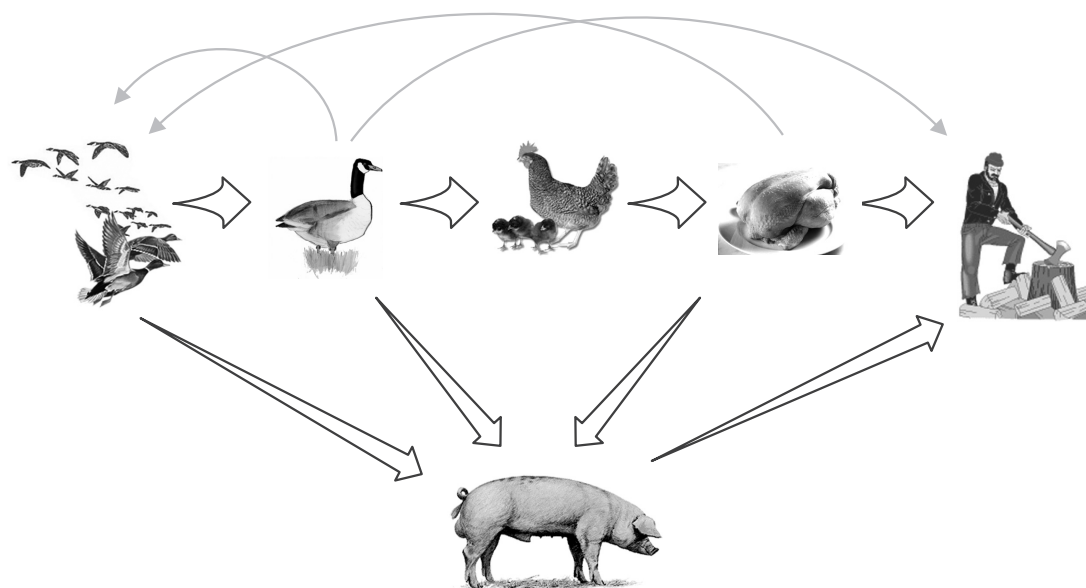


Figura 10.11. Ciclo natural dos alfavírus e WNV em animais silvestres e infecção acidental de humanos e espécies domésticas.



Fonte: adaptado de Webster et al. (2006).

Figura 10.12. Evolução do vírus da influenza A H5N1 por meio de infecções em várias espécies.

gam se manter indefinidamente nas respectivas populações.

3.4 Infecção de vetores

A infecção de vetores artrópodes (mosquitos, carrapatos) é uma importante forma de transmissão de alguns vírus, denominados genericamente *arbovírus*. Após a ingestão de sangue do hospedeiro infectado, o vírus replica no intestino e/ou nas glândulas salivares do inseto, podendo ser transmitido após um período de incubação de alguns dias (chamado de período *extrínseco* de incubação). A transmissão é consumada pela picada e inoculação de saliva contaminada em outro hospedeiro. Embora os insetos hematófagos tenham preferência por determinada espécie para se alimentar, podem ocasionalmente transmitir o agente a animais de outra espécie. De fato, a transmissão por vetores hematófagos oferece uma oportunidade ímpar para a transmissão interespecie de vários vírus. Mosquitos podem transmitir o WNV e os alfavírus das encefalites eqüinas entre aves, de aves para mamíferos (eqüinos, mamíferos silvestres) e de aves para humanos. Os vírus da WNV e VEEV já foram identificados em mais de uma dezena de espécies de mosquitos, embora se acredite que, em cada ecossistema, apenas uma ou poucas espécies desses insetos tenham papel preponderante na transmissão desses agentes. O vírus da febre amarela pode ser transmitido pela picada de mosquitos entre primatas, entre primatas e o homem e entre pessoas. O ASFV é transmitido por carrapatos entre suídeos silvestres e entre estes e suínos domésticos.

Em geral, acredita-se que a manutenção dos arbovírus na natureza depende da transmissão periódica a um hospedeiro vertebrado, ou seja, a infecção seria mantida pela replicação sequencial e alternada em hospedeiros vertebrados e invertebrados (os vetores). A manutenção dos arbovírus em épocas de pouca ou nenhuma atividade dos vetores, devido a temperaturas baixas, pode ser explicada em parte pela transmissão transovariana do agente e também pela infecção ocasional de hospedeiros vertebrados com hábitos de hibernação. Embora a capacidade de manutenção de vírus por longos períodos exclusivamente

nos hospedeiros invertebrados seja questionável, considera-se que esta seja uma das formas possíveis de sobrevivência desses microorganismos na natureza. Para o VEEV e WNV, já foi demonstrada a sobrevivência do vírus em larvas de mosquitos ao longo de períodos prolongados (meses) de clima frio.

3.5 Sobrevivência no ambiente

Os vírus necessitam células vivas para se multiplicar e a maioria deles não é capaz de resistir por muito tempo no meio ambiente. A sua resistência no ambiente depende da estabilidade física da partícula viral e das condições ambientais (temperatura, umidade, radiação solar). Os vírus sem envelope geralmente são capazes de resistir por mais tempo fora do hospedeiro (parvovírus, FMDV, enterovírus, adenovírus), embora alguns vírus envelopados (poxvírus, mixomavírus) também possam resistir por períodos consideráveis. Já foi demonstrado que o parvovírus canino (CPV) pode permanecer viável no ambiente, desde que protegido por material orgânico, por períodos de até seis meses. O parvovírus suíno (PPV) também pode resistir durante dias ou semanas em fezes e/ou em membranas e restos fetais. O parapoxvírus, agente do ectima contagioso de ovinos, pode permanecer viável durante meses nas crostas que se desprendem das lesões labiais dos animais afetados. O circovírus suíno (PCV) também pode permanecer viável por dias ou até semanas no ambiente. A contaminação de água, alimentos, solo, pastagens e mesmo de insetos pode servir de meio para transmissão desses agentes. Os vírus com envelope – especialmente aqueles que causam infecções respiratórias – são geralmente mais instáveis e, por isso, são mais rapidamente inativados por fatores físicos e/ou químicos ambientais. Os poxvírus estão entre os vírus envelopados com maior resistência ambiental. Embora possam resistir no ambiente por períodos consideráveis e, assim, ser transmitidos de forma indireta, esses vírus são freqüentemente transmitidos por contato direto ou indireto (Figura 10.13), ou seja, a transmissão indireta após um período de sobrevivência no ambiente representa uma estratégia adicional para assegurar a sua transmissão ao novo hospedeiro e perpetuação na população.

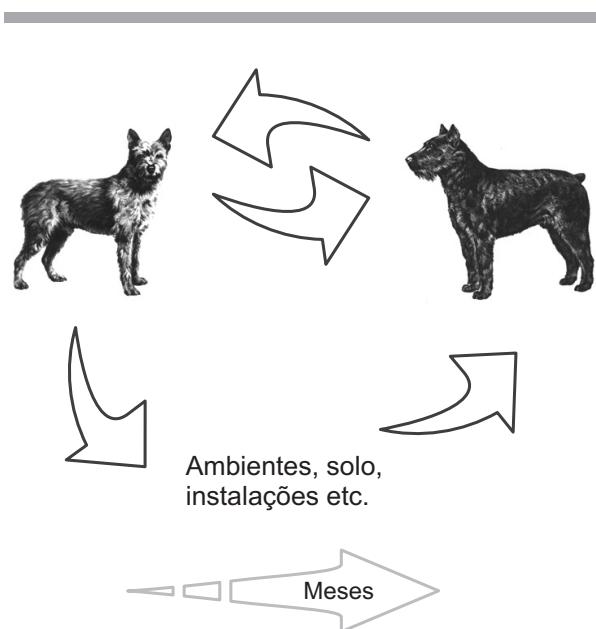


Figura 10.13. Sobrevivência ambiental dos vírus animais: parvovírus canino (CPV).

3.6 Transmissão vertical

A transmissão ao feto e/ou ao recém-nascido constitui-se em um importante mecanismo de prolongamento da existência de vários vírus

animais. Os retrovírus, arenavírus, alguns herpesvírus, parvovírus e alguns togavírus são frequentemente transmitidos aos fetos/neonatos. Em alguns desses vírus (retrovírus e arenavírus), os fetos ou recém-nascidos infectados tornam-se portadores e servem de fontes contínuas e permanentes de infecção. Uma forma especial de perpetuação por esse mecanismo é descrita para o BVDV, um pestivírus (família *Flaviviridae*) de ruminantes (Figura 10.14). A infecção de fetos bovinos entre os 40 e 120 dias de gestação frequentemente resulta na produção e nascimento de bezerros imunotolerantes, persistentemente infectados (PI). Os bezerros PI podem ser clinicamente saudáveis (embora frequentemente apresentem crescimento retardado e susceptibilidade aumentada a outras doenças) e excretam o vírus em secreções e excreções em grandes quantidades durante toda a vida. Os animais PI representam o principal meio de perpetuação do BVDV na natureza, servindo de fonte de vírus para as infecções agudas e outras infecções fetais persistentes. As infecções fetais que resultam em morte fetal e abortamento possuem um menor impacto epidemiológico, ainda assim os restos fetais (feto, fluidos, membranas) ou objetos inanimados con-

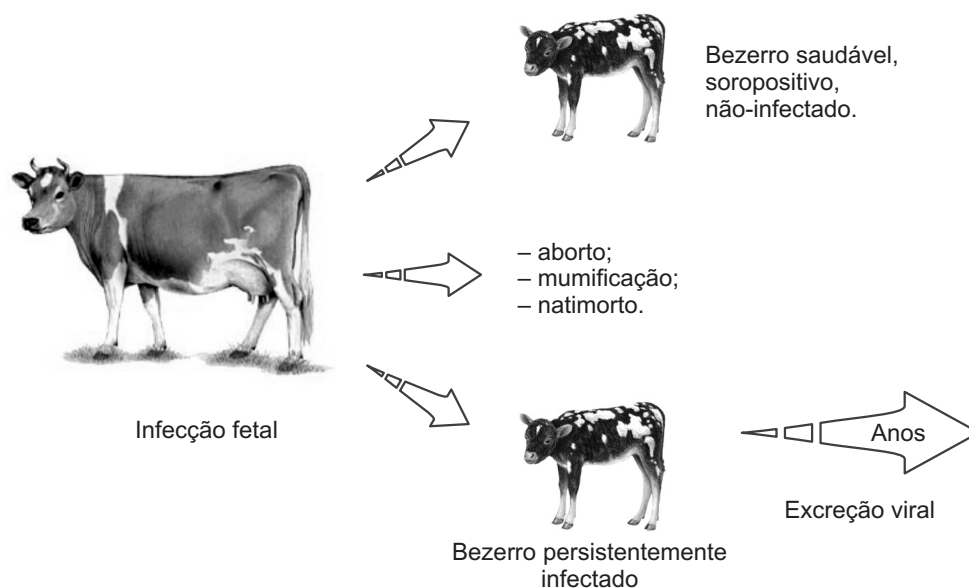


Figura 10.14. Transmissão vertical e infecção persistente pelo vírus da diarréia bovina (BVDV).

taminados podem servir de veículos para a transmissão do agente e facilitar a sua disseminação.

3.7 Ciclos contínuos de transmissão

As estratégias mencionadas acima são características de famílias ou de grupos de vírus e representam vantagens evolutivas que favorecem a perpetuação desses agentes na natureza. No entanto, alguns vírus que não utilizam essas estratégias também são capazes de se manter indefinidamente nas populações. Como não são capazes de persistir por longos períodos no hospedeiro (infecção latente ou persistente) ou de infectar vetores ou outras espécies animais, e não resistem por muito tempo no ambiente, a sobrevivência desses vírus depende da infecção seqüencial, imediata e contínua de novos hospedeiros de uma única espécie (Figura 10.15). Isso requer condições epidemiológicas específicas, que incluem a presença constante de um percentual alto de hospedeiros susceptíveis e condições de convivência que favoreçam o contato freqüente e, assim, a sua transmissão entre indivíduos.

Os vírus que causam infecções agudas são geralmente excretados por secreções oronasais (vírus respiratórios) ou pelas fezes (vírus entéricos) em altos títulos durante um curto espaço de tempo. Essas características, aliadas com a disponibilidade de hospedeiros susceptíveis e facilidade de contato, permitem a transmissão contínua e o prosseguimento da cadeia infecciosa. Exemplos de vírus que se mantêm dessa forma são: o CDV, os vírus respiratórios (bPI3v, NDV, BRSV), corono e rotavírus bovino, vírus da influenza (transmissão dentro da espécie). Não obstante, vários vírus que são capazes de utilizar as outras estratégias também podem ser mantidos por períodos longos por meio de ciclos contínuos de transmissão.

4 Doenças em populações

4.1 Definição de população

Em epidemiologia, define-se *população* como o grupo de indivíduos no qual se está estudando aspectos relacionados à saúde e à doença. A partir desse conceito, pode-se derivar duas de-

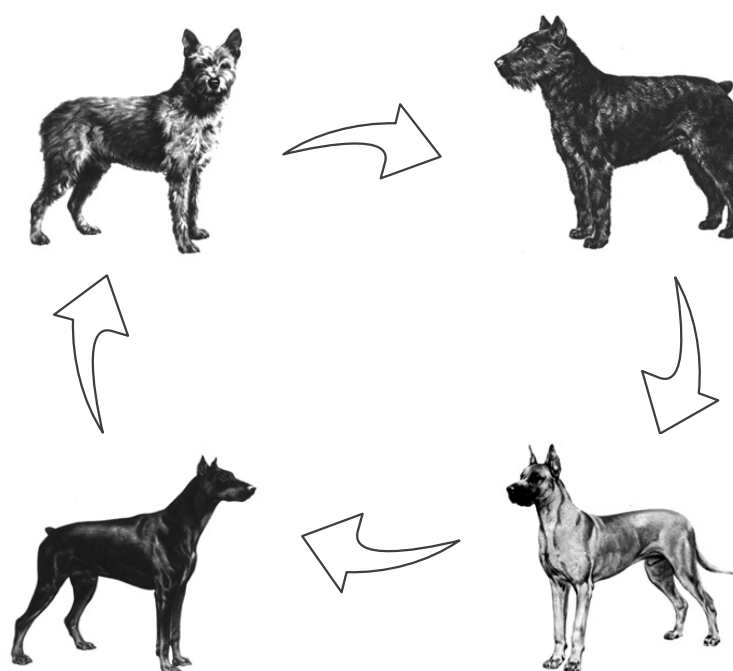


Figura 10.15. Ciclos contínuos de transmissão do vírus da cinomose (CDV).

finições, dependendo da delimitação geográfica e do número de indivíduos. *População local* é um grupo de indivíduos que habita uma determinada área, sujeito às mesmas condições e cujos indivíduos interagem frequentemente entre si. O termo *metapopulação* é mais abrangente e se refere a uma população maior, geralmente composta por várias populações locais, em que a migração de indivíduos entre populações locais é possível. Para algumas espécies de animais – sobretudo aquelas de interesse econômico –, os termos *rebanho* e *criação* são muito utilizados como sinônimo de população, principalmente quando se refere a populações locais.

O tamanho e as características das populações-alvo de estudos epidemiológicos são muito variáveis. Pode-se estudar os fatores que determinaram a ocorrência de cinomose em um canil, por exemplo. Nesse caso, a população-alvo é composta apenas pelos cães presentes no canil na época da ocorrência da doença. É uma população limitada e sob certo controle, o que caracteriza uma população local. Em um estudo da infecção pelo parvovírus em cães de uma cidade, a população-alvo abrange todos os cães da cidade. Essa é uma população com um número grande de indivíduos, de difícil enumeração e identificação, e, por isso, sobre a qual não se tem controle. Estudos de viroses em animais silvestres (febre amarela em primatas, raiva em morcegos) tratam de uma população de tamanho desconhecido e sobre a qual não se possui nenhum controle. Evidentemente, os estudos epidemiológicos em populações limitadas que habitam uma área restrita e sobre a qual se tem controle são mais facilmente exequíveis e produzem resultados mais objetivos e confiáveis. No entanto, estudos em populações numerosas de dimensões desconhecidas são, muitas vezes, necessários e, dependendo da metodologia empregada, podem também produzir resultados confiáveis e de grande utilidade. Nesses casos, geralmente, estuda-se apenas uma parcela da população, denominada *amostra*.

4.2 População de risco

O termo *população de risco* refere-se à parcela da população que é susceptível à infecção ou

enfermidade em questão. Se todos os indivíduos da população forem susceptíveis ao agente, a população de risco equivale à população total. A população de risco para a febre aftosa em uma população bovina não-vacinada, por exemplo, é composta por todos os bovinos da população, pois todos os animais são igualmente susceptíveis. Em outras situações, a população de risco é apenas uma parcela da população, que é susceptível à infecção ou à enfermidade. Em estudos de abortos por vírus em bovinos, a população de risco é constituída apenas pelas vacas prenhes. Estudos sobre as causas de mastite em bovinos contemplam apenas as vacas em lactação. A definição da população de risco é importante quando se quantifica os eventos de doença e se expressa em índices ou taxas. Esses cálculos devem sempre considerar a população de risco (e não a população total) como denominador.

4.3 Populações abertas e fechadas

Dependendo da possibilidade de contato com o meio exterior (e com outras populações), as populações de animais podem ser classificadas em abertas e fechadas. *Populações abertas* são aquelas sobre as quais não são impostas restrições à movimentação (entrada e saída) de animais e de subprodutos, estando, por isso, mais susceptíveis à introdução e disseminação de agentes infecciosos. As populações de cães de cidades são exemplos de populações abertas, pois não existem restrições à entrada e movimentação de animais oriundos de outras cidades ou regiões. Muitos rebanhos bovinos, principalmente aqueles de criação extensiva, também se enquadram nessa categoria pela ausência de medidas de biossegurança para impedir a entrada de agentes infecciosos. Nesses casos, as populações locais podem, com maior ou menor frequência, interagir com outras populações locais dentro de uma mesma metapopulação.

As *populações fechadas* são grupos de animais mantidos sob certo isolamento do meio exterior. As condições de isolamento – em nível e rigor variáveis – geralmente são impostas pelo homem com o intuito de evitar a introdução de agentes infecciosos e preservar a condição sanitária da po-

pulação. É possível manter populações fechadas com diferentes abrangências, desde rebanhos em propriedades, municípios, regiões, estados, países e até mesmo continentes. Rebanhos suínos ou granjas de aves livres de determinados patógenos (PRV, PRRSV, NDV) e que impõem restrições à introdução de quaisquer fatores que possam introduzir o agente são exemplos de populações pequenas fechadas. Por outro lado, países como os Estados Unidos impõem restrições à introdução de animais e subprodutos de outros países, com o objetivo de preservar seus rebanhos suíno e bovino livres do vírus da peste suína clássica (CSFV) e FMDV, respectivamente. A tendência é que criações comerciais de várias espécies animais se tornem progressivamente fechadas, a fim de preservar uma condição sanitária compatível com saúde animal e atividade econômica.

4.4 Quantificação de doença: incidência e prevalência

A quantificação dos eventos de doença nas populações se constitui em um dos instrumentos mais utilizados em epidemiologia. Essa quantificação é expressa sob a forma de taxas e coeficientes. Define-se *taxa* (ou índice) como uma fração em que o numerador é número de casos e o denominador é a população de risco, ou seja, é a expressão de uma frequência relativa de casos de uma determinada doença ou indicador de saúde. Dois índices muito utilizados em epidemiologia são a *incidência* e a *prevalência*. Embora sejam índices relacionados e, muitas vezes, confundidos, incidência e prevalência são índices que possuem composição, cálculo e significados distintos e, como tal, devem ser considerados e analisados.

O índice de *incidência* é mais utilizado para descrever a dinâmica de infecções agudas, em que o número de novos casos aumenta rapidamente com o decorrer do tempo. Define-se *incidência* como a frequência relativa de *novos casos* da doença (casos novos em relação a população de risco) que surgem em relação ao tempo. A incidência é calculada da seguinte forma:

$$\text{Incidência (\%)} = \frac{\text{Nº de casos novos}}{\text{População de risco (média)} \times \text{tempo}} \times 100$$

O cálculo da incidência sempre considera o parâmetro *tempo*, que pode ser dias, semanas, meses ou anos, dependendo da dinâmica da infecção. A incidência é uma frequência relativa que dá uma idéia da *dinâmica* da infecção ou doença. É expressa em percentagem (exemplo: 1% de novos casos por mês) ou fração (1/100.000 por mês) x tempo. A incidência também é denominada de *taxa de ataque* ou *morbidade incidente*.

A *prevalência* também é uma frequência relativa (número de casos/população de risco), porém determinada em certo momento (não considera a variável tempo). É utilizada principalmente para expressar a frequência de infecções ou doenças crônicas, ou de doenças que ocorram há algum tempo na população e cujo início não foi monitorado. Define-se *prevalência* como uma frequência relativa de casos de uma doença (ou de outro fator relacionado) em um determinado momento. O cálculo da prevalência não considera o parâmetro tempo e também pode ser expresso em percentual (p. ex.: 1% de infectados) ou fração (1/10.000).

$$\text{Prevalência (\%)} = \frac{\text{Nº de casos}}{\text{População de risco}} \times 100$$

A prevalência de infecções em rebanhos é frequentemente determinada por exames sorológicos que detectam anticorpos e indicam que houve uma exposição prévia ao agente. A frequência relativa de animais reagentes é chamada de *soro-prevalência*. Ao contrário da incidência, o índice de prevalência não fornece informações acerca da dinâmica da infecção, e sim da situação momentânea, ou seja, constitui-se em uma informação estática, pois não acompanha a evolução do processo infeccioso.

Outras taxas comumente utilizadas em epidemiologia são *morbidade*, *mortalidade* e *letalidade*. Taxa de *morbidade* é o percentual (ou fração) dos

animais expostos a um determinado agente que desenvolvem a doença. O cálculo dessa taxa pode considerar, como denominador, a população potencialmente exposta (abrange todos os animais do rebanho ou população) ou a população que realmente entrou em contato com o agente (somente os animais que foram infectados). No segundo caso, a taxa de morbidade seria um reflexo direto da patogenicidade do agente; no primeiro caso, seria o produto da patogenicidade e da transmissibilidade. Taxa de *mortalidade* é a fração dos animais (potencial ou realmente expostos) que vai a óbito em decorrência da infecção. Taxa de *letalidade* é o percentual dos animais doentes que vai a óbito (é uma medida da severidade da doença).

5 Padrões temporais de ocorrência das doenças

Os eventos de doença ocorrem continuamente com o decorrer do tempo, com frequência e distribuição temporal que podem variar de acordo com diversos fatores. Dependendo da distribuição da frequência ao longo do tempo, três padrões principais de ocorrência podem ser reconhecidos: doenças de ocorrência *esporádica*, *endêmica* e *epidêmica* (Figura 10.16). Os termos *endemia* e *epidemia* são utilizados para designar doenças de ocorrência endêmica e epidêmica, respectivamente. Os termos enzoótica e epizootica são utilizados para referir-se a doenças animais. Porém, como mencionado anteriormente, os termos epidemiológicos clássicos (endemia, epidemia) são também utilizados em epidemiologia veterinária.

5.1 Doenças esporádicas

As *doenças esporádicas* são aquelas que não estão presentes na população a maior parte do tempo e a sua ocorrência é caracterizada pelo aparecimento de um número geralmente pequeno de casos a intervalos variáveis, irregulares e imprevisíveis (Figura 10.16A). Tratando-se de doenças infecciosas, algumas possíveis explicações para esse comportamento são: a) o agente está sempre presente no ecossistema, porém em

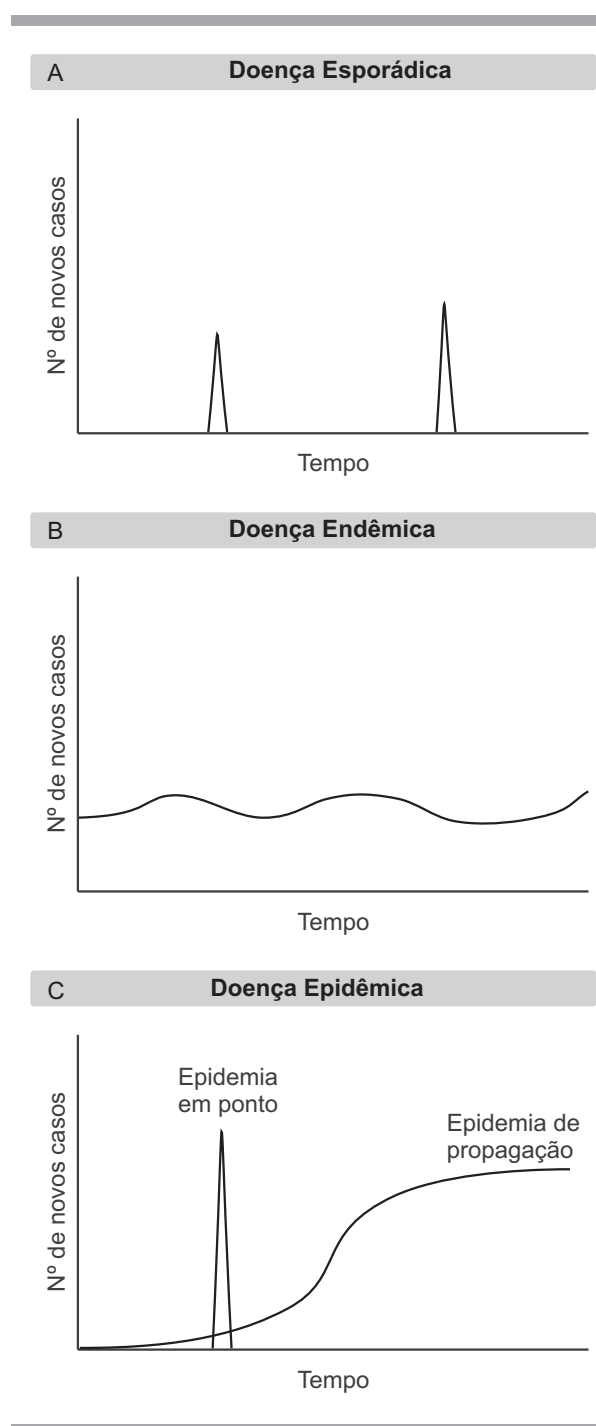


Figura 10.16. Padrões temporais de ocorrência de doenças.

reservatórios (outras espécies animais). Esses reservatórios apenas ocasionalmente entram em contato e transmitem o agente para a espécie em questão, desencadeando o aparecimento da doença (p. ex.: casos de infecção pelo vírus ebola em pessoas na África, hantavirose em humanos no Brasil); b) o agente está sempre presente na população, porém causando infecções subclínicas

na maioria e doença em uma minoria dos indivíduos, ou seja, a infecção raramente causa a doença. Assim, a infecção seria endêmica e a doença seria esporádica (p. ex.: a infecção pelo BLV em bovinos é endêmica; a ocorrência do linfossarcoma causado pelo BLV é esporádica); c) o agente não está presente na população na maior parte do tempo, sendo esporadicamente introduzido. Quando é introduzido, ocasiona os eventos de doença (p. ex.: casos de febre aftosa nos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul nos últimos anos).

5.2 Doenças endêmicas

Doenças endêmicas ou endemias (enzootias) são aquelas que ocorrem continuamente, com frequências pouco variáveis – e, portanto, razoavelmente previsíveis na população – ao longo do tempo (Figura 10.16B). Em outras palavras, a infecção é dita *nativa* da população. Infecções endêmicas são geralmente mantidas pela ocorrência simultânea e contínua de múltiplas cadeias de transmissão do agente entre hospedeiros suscetíveis. Três componentes são absolutamente necessários para que uma infecção seja endêmica em uma população: a) a presença do agente; b) o número/proporção adequado(a) de hospedeiros suscetíveis e c) a presença dos mecanismos de transmissão. A ausência de um desses componentes preclui a ocorrência endêmica da doença. Uma infecção ou doença pode ser endêmica em diferentes níveis (hipoendêmica [incidência baixa], mesoendêmica [incidência moderada], hiperendêmica [incidência alta] e holoendêmica [incidência altíssima]), dependendo do número/proporção de animais que afeta. Exemplos de infecções víricas endêmicas em populações animais são abundantes: cinomose e parvovirose em cães, infecção pelo BVDV e BoHV-1 em bovinos de muitos países, rotavirose e parvovirose suína, leucose enzoótica bovina, entre outras.

O termo *endêmico* refere-se ao padrão temporal de ocorrência de uma doença em uma determinada população. Por isso, quando se refere uma doença endêmica, é preciso, necessariamente, mencionar a população em questão, pois essa doença pode não ser endêmica em outras popu-

lações. A infecção pelo BoHV-1, por exemplo, é endêmica na população bovina do Brasil. Para infecções que ocorram endemicamente em todo o mundo, não é necessário especificar a população. Por exemplo, a parvovirose é uma doença endêmica na população canina (fica implícito que se trata da população mundial).

5.3 Doenças epidêmicas

Doenças de ocorrência *epidêmica* ou *epidemias* (epizootias) são aquelas que se caracterizam pela ocorrência de um número excessivo e inesperadamente alto de casos em um determinado período em uma população (Figura 10.16C), ou seja, ocorre com uma frequência inesperada em certo intervalo de tempo. Os termos *epidemia* (epizootia) e *surto* são comuns e indistintamente utilizados para designar esses eventos. *Surto* é um termo popular e tem sido utilizado mais amiúde para referir-se a eventos restritos geograficamente; enquanto *epidemia* é um termo técnico, mais comumente (mas não exclusivamente) utilizado para designar eventos mais abrangentes geograficamente. No entanto, deve-se enfatizar que não existe uma distinção clara entre esses dois conceitos e ambos são utilizados indistintamente para se referir a esses eventos.

A caracterização de uma epidemia necessariamente requer a consideração dos parâmetros *frequência* (número excessivo de casos), *tempo* (dia, semana, mês, ano) e *espaço* (população). Uma epidemia não pode ser definida pelo número absoluto de casos, e sim pelo número relativo, que deve ser comparado com o número de casos esperado para o respectivo período naquela população. Por exemplo, um *único caso* de febre aftosa nos Estados Unidos (EUA), em 2006, pode configurar estatisticamente uma epidemia, pois a frequência esperada era zero. Por outro lado, 1.000 casos de doença causada pelo PRRSV no estado de Nebraska, EUA, em maio de 2006, pode não configurar uma epidemia, pois pode ser semelhante à frequência observada nos meses anteriores. Estatisticamente, considera-se uma epidemia sempre que o número de casos exceder 1,96 desvio padrão acima da média de casos esperados para aquele intervalo de tempo.

As dimensões de uma epidemia podem variar amplamente de acordo com o número de animais afetados e área ocupada pela população. A introdução de um animal infectado pelo BVDV em um rebanho de cria, por exemplo, pode resultar em um surto localizado de abortos naquela propriedade. Mordeduras de morcegos em bovinos e eqüinos produzem surtos de raiva que, freqüentemente, atingem uma ou mais propriedades vizinhas. O surto de febre aftosa no Rio Grande do Sul (RS), em 2000, e no Mato Grosso do Sul (MS), em 2005, envolveu vários municípios; na Argentina, em 2000, houve o envolvimento de várias províncias e, na Inglaterra, atingiu praticamente todo o país. Epidemias pequenas (envolvendo rebanhos ou populações pequenas) provavelmente ocorram continuamente em populações animais do mundo inteiro, sem despertar a atenção. No entanto, algumas epidemias atingem grandes proporções por envolver países e até mesmo continentes. A epidemia de SARS (2003-2004) atingiu grande parte da Ásia, alguns países europeus e o Canadá. Epidemias que atingem populações de continentes ou eventualmente de todo o mundo são denominadas *pandemias*, das quais a parvovirose canina (a partir da década de 1980) e a infecção pelo HIV constituem-se em exemplos contemporâneos.

Dois tipos de epidemia podem ser reconhecidos de acordo com a dinâmica (taxa de aumento da incidência de acordo com o tempo) e duração, refletindo doenças com diferentes formas de transmissão e propagação. As *epidemias em ponto* são caracterizadas por um aumento brusco, de magnitude variável e curta duração, no número de novos casos (Figura 10.16C). Geralmente são resultantes de exposição simultânea de vários indivíduos ao agente, seja diretamente na fonte de infecção (animal infectado), em água, alimentos, aerossóis ou em produtos contaminados. São características de infecções altamente transmissíveis (FMDV, CSFV, influenza) ou de infecções transmitidas maciça e simultaneamente por uma fonte comum de infecção. Ocorrem freqüentemente pela ingestão de água ou alimentos contaminados aos quais os animais têm acesso simultaneamente. Caracterizam-se por uma grande concentração de novos casos em um curto espaço

de tempo. A introdução de um animal infectado pelo FMDV em um rebanho pequeno susceptível provavelmente resultará em uma epidemia com essas características. Essas epidemias geralmente possuem curta duração. Epidemia em torre, maciça, de fonte comum ou hídrica são sinônimos utilizados para designar eventos com essas características.

As *epidemias de propagação* são aquelas em que a incidência aumenta gradualmente – e não de forma explosiva – à medida que novos animais vão sendo infectados, transmitem o agente a novos hospedeiros e apresentam sinais clínicos (Figura 10.16C). São características de infecções transmitidas por contato direto ou indireto. A epidemia da AIDS em humanos, a parvovirose em cães e a PRRS em suínos são exemplos recentes de epidemias de propagação. Epidemias de propagação geralmente possuem duração prolongada.

Acredita-se que, mesmo em populações de animais silvestres e sem a intervenção humana, as epidemias sejam autolimitantes e não continuem indefinidamente. O fim das epidemias ocorre eventual e inevitavelmente pelo esgotamento dos susceptíveis, tanto pela morte como pelo desenvolvimento de imunidade pelos indivíduos.

Algumas enfermidades epidêmicas em seu início, principalmente aquelas causadas pela introdução de um agente novo na população, podem se tornar endêmicas com o decorrer do tempo. Exemplos são a parvovirose canina e a PRRS, que, após um início explosivo, se tornaram endêmicas nas populações canina e suína de vários países, respectivamente. A infecção pelo WNV foi introduzida nos EUA, em 1999, quando resultou em epizootias/epidemias em aves e humanos. Após esta introdução e início epidêmico, a infecção se estabeleceu no ecossistema e se tornou endêmica em vários estados norte-americanos. Recentemente o WNV foi detectado no noroeste da América do Sul e também na Argentina. Outras epidemias se tornam restritas temporariamente (por fatores naturais ou por medidas de controle) e não persistem de forma endêmica na população. Exemplos recentes incluem a SARS e as ocorrências de febre aftosa no RS, em 2000; no MS, em 2005; e na Inglaterra, em 2001, cujas me-

didadas de combate resultaram na erradicação do agente e no término das respectivas epidemias.

5.4 Fatores determinantes das epidemias

Os surtos de doenças víricas resultam do desequilíbrio das interações agente-hospedeiro-meio ambiente e podem ser potencialmente determinados por inúmeros fatores que podem atuar individualmente ou em conjunto. Os surtos de febre aftosa no RS e Grã-Bretanha, em 2000-2001, por exemplo, foram determinados pela introdução do agente em populações susceptíveis. A pandemia de parvovirose canina, a partir da década de 1980, foi determinada pelo surgimento de um novo vírus na espécie canina, a partir da mutação/evolução do vírus da panleucopenia felina. A pandemia de AIDS provavelmente originou-se há décadas pela transmissão e adaptação de um vírus de primatas (vírus da imunodeficiência símia [SIV]) para humanos. Os surtos anuais de gripe em humanos devem-se, entre outros fatores, à contínua evolução e variação antigênica do vírus. A influenza denominada “gripe do frango”, que acomete pessoas e aves na Ásia desde 1997, deve-se a um vírus de aves que sofreu mutações sucessivas e tornou-se mais virulento para aves silvestres e domésticas e capaz de infectar pessoas. O PRRSV de suínos provavelmente se originou de um vírus de roedores (*lactate dehydrogenase elevating virus*, LDEV) que sofreu mutações e adaptação em suídeos silvestres, sendo posteriormente transmitido e disseminado entre suínos domésticos. O vírus da SARS que infectou milhares de pessoas na Ásia, Europa e Canadá, em 2003-2004, provavelmente se originou e foi transmitido a humanos a partir de espécies de animais silvestres.

Alteração em fatores ambientais, sem modificações evidentes no agente, também podem resultar em um aumento expressivo da frequência de doenças. A superpopulação de morcegos hematófagos em determinadas áreas, devido a alterações ecológicas, são acompanhadas de surtos de raiva em herbívoros. Mudanças ecológicas relacionadas com a agricultura têm causado aumento da população e mudança de hábitos de

roedores silvestres que servem de reservatórios para os hantavírus e arenavírus. Essas alterações têm sido implicadas na ocorrência de hantavirose e doença hemorrágica por arenavírus em humanos. O estresse do transporte e aglomeração ao qual bezerros são submetidos após o desmame tem sido associado com surtos de viroses respiratórias (BoHV-1, BRSV) e encefalite herpética (BoHV-5). A temperatura e umidade no verão favorecem a proliferação de vetores e a consequente ocorrência de arboviroses (WNV, encefalites equínas, dengue). A aglomeração de cães em canis e *pet shops* pode favorecer o contato entre os animais e a consequente transmissão do CDV e vírus respiratórios, entre outros.

A falha de cobertura vacinal na população em um determinado ano pode resultar em surtos de doenças que normalmente são endêmicas e cuja frequência é geralmente baixa. A reativação de infecções latentes, geralmente associada com fatores ambientais (estresse, má nutrição, aglomeração, mudança de alimentação) tem sido frequentemente responsabilizada por surtos de doenças associadas ao BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos. Esses fatores ambientais podem também atuar em conjunto sobre o sistema imunológico, predispondo os animais a outras enfermidades.

Em resumo, virtualmente, qualquer fator do agente, do hospedeiro e do meio ambiente que determine direta ou indiretamente o aumento na frequência esperada de uma doença pode ser considerado o fator determinante de uma epidemia. A origem e os fatores determinantes de surtos podem ser frequentemente determinados pela realização de investigações epidemiológicas criteriosas e sistemáticas. No entanto, em muitas situações, as interações que produzem esses eventos são muito complexas e não permitem a identificação da origem e dos fatores responsáveis.

5.5 Outros padrões de ocorrência

Além dos padrões clássicos de ocorrência, algumas infecções víricas agudas apresentam variações de incidência diferentes dos descritos acima. Várias infecções víricas agudas apresentam aumentos de incidência coincidentes com

determinadas estações do ano. Virose respiratórias (BRSV, parainfluenza canina) geralmente apresentam picos de incidência no inverno; em contraste, algumas viroses entéricas e arboviroses apresentam picos no verão. Esse tipo de comportamento é denominado *sazonal* ou *estacional*, e o aumento de incidência verificado nessas épocas deve-se geralmente à ação direta ou indireta de fatores climáticos sobre os hospedeiros, vetores e/ou agentes. A maior incidência de viroses respiratórias no inverno deve-se a fatores como aglomeração de indivíduos, ventilação deficiente, estresse térmico, umidade, temperatura e facilidade de transmissão dos vírus. A maior incidência de arboviroses nos meses quentes deve-se ao aumento da população e atividade dos artrópodes vetores. A causa de sazonalidade de algumas infecções víricas, no entanto, não é facilmente explicável e pode envolver múltiplas interações de fatores climáticos com o hospedeiro e com o agente.

Doenças com *variações cíclicas* apresentam aumentos de incidência a intervalos maiores do que um ano. Os picos geralmente ocorrem quando a imunidade da população, que atinge o seu máximo logo após cada pico, atinge níveis criticamente baixos após um período de redução gradativa. Esse padrão de ocorrência é mais facilmente reconhecido em populações humanas (o sarampo apresenta picos a cada 2-3 anos; rubéola a cada 5-7 anos) e de animais silvestres, pois os animais domésticos de interesse econômico frequentemente têm o seu ciclo de vida interrompido devido à finalidade produtiva.

Doenças com *tendência secular* são aquelas cuja incidência apresenta uma redução ou aumento muito lento ao longo de anos e décadas. Essas variações devem-se, em geral, a alterações ecológicas graduais e progressivas, mudanças de hábitos e de práticas de manejo, e a medidas gerais de profilaxia e controle das doenças animais.

6 Distribuição espacial das infecções víricas

As infecções víricas apresentam distribuições geográficas diversas que dependem da

presença e da interação entre vários fatores. Os requerimentos mais óbvios para a ocorrência de uma infecção e doença em uma determinada população são a presença do agente e de hospedeiros susceptíveis. No entanto, outros fatores epidemiológicos são determinantes da distribuição geográfica das viroses animais. A existência e número de reservatórios e vetores, condições favoráveis para a sobrevivência e transmissão do agente, barreiras naturais ou artificiais, medidas de controle e/ou erradicação (incluindo vacinação), sistemas de produção, entre outros, contribuem para os diferentes padrões de distribuição e localização das infecções víricas.

6.1 Doenças víricas de distribuição mundial

As viroses de animais de companhia, sobre os quais geralmente não se impõe restrições à movimentação e que não se constituem em alvos de programas sanitários oficiais, geralmente possuem uma distribuição ampla, muitas vezes mundial. Enquadram-se nessa categoria as principais infecções víricas de cães e gatos. Embora amplamente difundidas na população, essas viroses certamente apresentam diferenças de prevalência e de incidência entre populações, refletindo peculiaridades epidemiológicas locais e medidas voluntárias de controle eventualmente praticadas. Populações de cães e gatos que vivem em condições isoladas (ilhas, comunidades remotas) podem ocasionalmente ser livres de algumas dessas viroses. Algumas infecções víricas de animais de interesse econômico (BoHV-1, bPI3v, BVDV, rotavírose, coronavírose, parvovírose suína) também possuem distribuição mundial, embora algumas delas tenham sido alvos recentes de programas de erradicação e, atualmente, estejam erradicadas de alguns países. A maioria das viroses humanas também possui distribuição mundial, embora possam apresentar níveis variáveis de ocorrência nas diferentes subpopulações. Algumas viroses humanas já foram erradicadas mundialmente (varíola) ou estão em vias de erradicação em vários países (poliomielite, sarampo).

6.2 Doenças víricas com certa limitação geográfica

Algumas infecções víricas – sobretudo as arboviroses – embora possam apresentar uma distribuição relativamente ampla e possam acometer populações de vários continentes, possuem certa limitação geográfica. A delimitação da ocorrência dessas infecções é geralmente determinada pela existência de condições climáticas para a sobrevivência e atividade dos insetos envolvidos na transmissão do agente. Enquadram-se nessa categoria a dengue, a febre amarela, algumas infecções por alfavírus, flavivírus e outras arboviroses (WNV, VEEV). A distribuição dessas infecções coincide com uma faixa territorial de certa amplitude latitudinal, onde as condições climáticas são favoráveis à sobrevivência e à atividade dos vetores. Essas enfermidades podem, ocasionalmente, ser detectadas em áreas remotas e que não apresentam condições para a perpetuação dos vetores, mas dificilmente se tornam endêmicas nessas regiões.

6.3 Doenças víricas restritas geograficamente

Algumas infecções víricas apresentam uma distribuição geográfica restrita, ficando limitadas a determinadas regiões ou países. A peste suína africana ocorre endemicamente na África, provavelmente pelas condições epidemiológicas favoráveis (população suscetível, reservatórios, vetores, falta de medidas de biossegurança). Esporadicamente introduzida na Europa e no Brasil no passado, a doença foi rapidamente erradicada e não se tornou endêmica. A doença do vale Rift, enfermidade zoonótica que afeta várias espécies de mamíferos domésticos e silvestres, tem sido historicamente restrita a uma região da África. Ocasionalmente detectada fora do continente africano (Oriente Médio e Ásia), aparentemente não encontrou condições para se manter endemicamente. A retrovírose Maedi-Visna foi inicialmente identificada em ovinos/caprinos da Islândia e tem ficado praticamente restrita a esse país insular. O vírus Hendra (um morbilivírus de morcegos) ultrapassou a barreira interespecies e

infectou humanos e eqüinos na Austrália, estando, até então, limitado àquele continente. Evento similar ocorreu na Malásia e Indonésia, onde o vírus Nipah (também um morbilivírus de morcegos) infectou e provocou doença em pessoas e grande mortalidade em suínos. Outro exemplo de infecção vírica restrita geograficamente é o associado ao vírus ebola, cujos eventos epidêmicos concentram-se quase que exclusivamente na África Central. As infecções pelos vírus das encefalites eqüinas do leste e oeste (EEEV, WEEV) também possuem certa delimitação geográfica, que é determinada pelas interações do agente com seus vetores e hospedeiros. Esses agentes, no entanto, têm sido também detectados fora de seus nichos ecológicos originais, o que pode, eventualmente, caracterizar uma expansão de sua abrangência.

A restrição geográfica de muitas dessas viroses pode possuir caráter apenas circunstancial e pode ser modificada ocasionalmente, acompanhando alterações ecológicas ou epidemiológicas. A doença do Nilo Ocidental (WNV), causada por um flavivírus transmitido por insetos e cujos hospedeiros naturais são várias espécies de pássaros e outras aves silvestres, por exemplo, estava historicamente restrita ao nordeste do continente africano, a alguns países do Oriente Médio e à Europa mediterrânea (casos isolados). Introduzida, em 1999, nos Estados Unidos, a infecção pelo WNV rapidamente se disseminou e se tornou endêmica no país e está avançando na direção sul em países da América Central e Caribe. Outro exemplo recente de expansão geográfica foi o vírus da língua azul (BTV), que atingiu rebanhos ovinos da Holanda, Alemanha e Bélgica, em 2006, provavelmente a partir da África, onde a infecção é endêmica.

6.4 Áreas livres naturais

Algumas populações de animais são naturalmente livres de determinadas infecções víricas. Essas populações (ou as áreas que habitam) são ditas *indenes* sem relação à doença e *livres* em relação ao agente. Essas áreas foram mantidas livres do agente ao longo de décadas, sobretudo, pela existência de barreiras naturais que dificultavam a sua introdução. A Austrália é naturalmente in-

dene à raiva animal (silvestre e urbana) e febre aftosa, condições favorecidas pela sua localização geográfica. O Chile manteve-se livre de febre aftosa durante décadas, apesar da situação endêmica da infecção na América do Sul, também graças à cordilheira dos Andes, que serviu de barreira natural contra a introdução do agente. Embora muitas dessas áreas tenham se mantido historicamente livres de doenças graças à existência de barreiras naturais, a manutenção dessa condição, nos últimos anos, também deveu-se à imposição de barreiras artificiais. A condição de área livre também pode ser meramente circunstancial, pois o agente pode ser potencialmente introduzido a partir de áreas endêmicas.

6.5 Áreas livres artificiais

Vários países têm envidado esforços e conseguido erradicar viroses outrora endêmicas em seus rebanhos. O BLV, BoHV-1 e PRV foram erradicados de alguns países europeus; a febre aftosa e a peste suína clássica (PSC) foram erradicadas de grande parte do Brasil. Embora existam apenas alguns relatos remotos de ocorrência de casos, a PSC e febre aftosa foram erradicadas dos EUA há muitas décadas. O PRV foi erradicado de vários países europeus e recentemente da população suína comercial dos EUA. Esforços de erradicação de doenças víricas têm sido empreendidos por vários países e, se bem-sucedidos, resultarão em novas áreas livres. As principais viroses-alvo de programas de erradicação são aquelas sob regulação internacional que restringe a movimentação de animais e subprodutos.

7 Doenças víricas emergentes

As últimas décadas têm testemunhado o surgimento e ressurgimento de várias enfermidades víricas em populações humanas e animais. As causas da emergência de algumas dessas enfermidades já foram parcialmente esclarecidas e parecem envolver diversos fatores que atuam individualmente ou em conjunto. Em geral, a emergência/reemergência de enfermidades víricas está associada com: a) surgimento de um novo vírus na população ou espécie; b) muta-

ção/variação genética de um vírus já existente na população; c) alterações ecológicas que afetam as interações entre os hospedeiros, reservatórios e vetores, ou d) ação do homem através dos sistemas de criação, manejo, transporte e comercialização/utilização de animais.

O HIV surgiu na África, entre 1940 e 1950, provavelmente a partir de um vírus de primatas não-humanos (*simian immunodeficiency virus*, SIV). Acredita-se que o SIV tenha sido transmitido de macacos a pessoas pelo contato com o sangue ou outros fluidos corporais, proporcionado por práticas como caça, abate e alimentação. Após atravessar a barreira interespecie, o novo vírus foi gradativamente se adaptando e disseminando na população humana. Atualmente o HIV está amplamente difundido na população humana e representa um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, ou seja, a epidemia de AIDS deveu-se ao surgimento de um novo vírus na população humana.

Outro exemplo de vírus que atravessou a barreira entre espécies e alterou o seu espectro de hospedeiros foi o parvovírus canino (CPV). O CPV surgiu como patógeno de cães no final dos anos 1970, a partir de mutações nas proteínas do capsídeo do parvovírus causador da panleucopenia felina (FLPV). Como consequência dessas alterações genéticas, o parvovírus teve a sua gama de hospedeiros alterada, adquirindo a habilidade de infectar e causar doença em cães. Nos anos que se seguiram ao surgimento desse novo vírus na espécie canina, as cepas de parvovírus eram altamente virulentas. Ao longo dos anos, no entanto, as cepas de alta virulência foram sendo gradativamente substituídas na população por cepas menos virulentas, o que indica uma adaptação gradativa aos novos hospedeiros.

O vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV), um alfavírus zoonótico transmitido por insetos, tem sido implicado em epidemias e epizootias (em eqüídeos) de grandes proporções no norte e noroeste da América do Sul nas últimas décadas. Esses eventos se repetem a intervalos de aproximadamente 10 anos. No intervalo entre os surtos, não há evidência de atividade viral nas populações de eqüinos ou de humanos, mas o vírus provavelmente permaneça circulando no seu

ambiente natural, infectando pequenos mamíferos silvestres. Os vírus que circulam nas populações silvestres nesses períodos – denominados *enzoóticos* –, embora capazes de infectar eqüinos e pessoas, produzem baixos níveis de viremia e são virtualmente apatogênicos para essas espécies. Periodicamente esses vírus sofrem mutações que os tornam patogênicos e capazes de produzir altos níveis de viremia em eqüinos. Esses vírus – denominados *epizoóticos* – são, então, transmitidos aos eqüinos, nos quais são amplificados e disseminados nessa espécie e também para humanos, causando epidemias/epizootias de grandes proporções. Os surtos periódicos de VEE são exemplos da reemergência de doenças devido a mutações/alterações genéticas de vírus preexistentes no ecossistema.

O PRRSV foi inicialmente identificado como patógeno de suínos no final dos anos 1980, nos EUA, e no início dos anos 1990, na Europa. A hipótese mais aceita é que o agente tenha se originado de um vírus muito semelhante de roedores (*lactate dehydrogenase elevating virus*, LDEV). O LDEV teria sido transmitido de roedores para suídeos silvestres na Europa há, aproximadamente, um século. Posteriormente, teria sido transmitido a suínos domésticos e introduzido nos EUA no início de século 20 pela importação de animais. A partir daí, o vírus teria evoluído na espécie suína paralelamente nos dois continentes. Qual a razão, então, para o seu “surgimento” apenas nos anos 1980-1990? A explicação mais plausível é que, embora presente nesses países há décadas, a grande disseminação teria apenas ocorrido nas duas últimas décadas, por modificações drásticas nas práticas de manejo, comercialização, intercâmbio intensivo de reprodutores e uso indiscriminado da inseminação artificial.

O coronavírus causador da SARS (SARS-CoV) emergiu na Ásia, em 2003, como um vírus novo na população humana. O seu surgimento parece ter envolvido a interação de fatores ecológicos e virais. Estudos epidemiológicos iniciais indicavam as civetas (*civet cats*) – pequenos carnívoros silvestres domesticáveis e utilizados também para alimentação humana – como provável origem do agente. Estudos mais recentes, no entanto, indicam uma espécie de morcego

(*Rhinonophus sinicus*) como provável hospedeiro natural do vírus. Não obstante, a análise filogenética desse vírus sugere que eventos de mutação ou recombinação, envolvendo coronavírus aviários e de mamíferos, tenham ocorrido no passado. Aliado a fatores ambientais e culturais, esses eventos genéticos podem ter contribuído para a capacidade do agente de infectar diferentes espécies silvestres e, eventualmente, ser transmitido a humanos. A transmissão a humanos foi seguida de uma rápida disseminação no sudeste asiático, estendendo-se para alguns países europeus e para o Canadá pela movimentação de pessoas. Felizmente as medidas profiláticas adotadas foram capazes de restringir a disseminação e, eventualmente, resultaram no final na epidemia.

Dois exemplos de doenças que emergiram devido a alterações ecológicas foram as causadas pelos vírus Nipah e Hendra. Esses vírus cruzaram a barreira interespecies e causaram doença e mortalidade em animais e pessoas na Malásia e Austrália, respectivamente. O desmatamento indiscriminado, seguido de queimadas nas florestas da Malásia em 1997-1998, deslocou populações de morcegos frugívoros da espécie *Pteropus* (conhecidos como “raposas voadoras”) de seu *habitat* natural. Essas populações foram, então, procurar abrigo e alimento em pomares domésticos, alguns deles localizados em granjas de suínos. Como consequência da proximidade, os suínos se infectaram ao ingerir restos de frutas contaminadas com a saliva dos morcegos infectados. O vírus Nipah se disseminou rapidamente em granjas com alta concentração de animais, contaminando e causando doença grave em suínos e humanos. Evento similar ocorreu na Austrália em 1994-1995, quando eqüinos foram contaminados com outro morbilivírus, o vírus Hendra, pelo contato com excreta e restos placentários de morcegos contaminados. Essa enfermidade foi mais restrita, mas atingiu e ocasionou a morte de vários eqüinos e de algumas pessoas que tinham contato com esses animais. O vírus da febre do Vale Rift (RVFV), um vírus bunivírus zoonótico transmitido por insetos, também tem sido associado com eventos epidêmicos de proporções consideráveis em humanos e animais domésticos em alguns países da África. Um des-

ses eventos foi associado com a abertura de uma grande represa no Egito, seguida de enchentes e alagamentos. Essas condições propiciaram uma proliferação rápida e abundante de insetos e a conseqüente disponibilidade de vetores para a transmissão do agente.

O WNV emergiu na América do Norte no ano de 1999, inicialmente produzindo doença e mortalidade em aves silvestres (corvos, pardais) e de zoológicos, acompanhada de alguns casos de doença humana. Até então, a infecção pelo WNV estava restrita ao nordeste do continente africano e a alguns países do Oriente Médio e Europa mediterrânea. Nesses locais, a infecção ocorria sob a forma de surtos restritos geograficamente e atingindo um número limitado de pessoas e/ou de animais. O vírus provavelmente foi introduzido no continente americano pelo movimento migratório de aves a partir da África (aves silvestres são os seus hospedeiros naturais), importação ilegal de aves ornamentais contaminadas ou pelo transporte de mosquitos contaminados em navios e/ou aviões. Após a introdução, o WNV encontrou condições ecológicas e rapidamente se disseminou nos EUA, ocasionando doença em aves (mais de 150 espécies de pássaros e outras aves são naturalmente susceptíveis), humanos (aproximadamente 700 mortes até meados de 2007) e em animais domésticos (mais de 25 mil casos em equinos até julho de 2007). A infecção em humanos tem assumido características até então não relatadas, como ocorrência esporádica de transmissão transplacentária e neonatal, além de transmissão por transfusão sangüínea e transplante de órgãos. O vírus já foi detectado em alguns países da América Central e, recentemente, foi detectado na Colômbia (2004-2005) e Argentina (2006).

São vários os exemplos de doenças víricas emergentes de animais domésticos e humanos cujos agentes se originaram de animais silvestres. O caminho inverso, ou seja, transmissão de agentes víricos de animais domésticos para espécies silvestres, embora menos freqüente, também tem sido bem documentada. O vírus da cinomose (CDV), um morbilivírus canino, tem sido freqüentemente associado com eventos de doença em animais silvestres. O vírus foi asso-

ciado com surtos de alta mortalidade em focas (>10.000) e outros mamíferos nos mares Mediterrâneo e Cáspio no início do século 21, e no lago Baikal, Rússia, em 1997/1998. O CDV também foi associado com mortalidade de leões e hienas em uma reserva natural da Tanzânia, e tem sido esporadicamente isolado de doença em mãos-peladas (*racoons*), felídeos e outros animais silvestres de vida livre ou de zoológicos. Um estudo retrospectivo demonstrou antígenos do CDV em amostras de, aproximadamente, 50% dos leões e tigres que morreram entre 1972 e 1992 em zoológicos da Suíça.

O vírus da influenza A de aves (H5N1), provavelmente por meio de mutações sucessivas e adaptação gradativa, tornou-se virulento para aves domésticas e silvestres e infeccioso para humanos, causando centenas de mortes na Ásia a partir de 1997. Durante esse surto, dois tigres e dois leopardos de zoológicos da Tailândia foram infectados com o H5N1 e morreram. A reemergência do H5N1 a partir de 2004 tem resultado em uma disseminação maior, atingindo aves silvestres e domésticas e pessoas de países da Ásia, Oriente Médio e Leste Europeu. Esse vírus está sendo considerado o candidato mais provável e temido a causar uma *pandemia* de gripe na população humana nos próximos anos.

É provável que o surgimento e ressurgimento de enfermidades víricas continuem a ocorrer com o decorrer do tempo em razão de alterações ecológico-ambientais, modernização de sistemas de manejo, produção e reprodução e também por causa da evolução natural (mutação + seleção) desses agentes. O exemplo mais recente foi a transmissão de um vírus da influenza (H3N8) de equinos para cães nos Estados Unidos em 2004. Relatos iniciais indicaram que o *novo vírus* está se disseminando eficientemente da população de cães de carreira naquele país. A recente transmissão do vírus da influenza para felídeos domésticos (gatos) e selvagens cativos (tigres e leopardos) também se constituiu em um evento inusitado.

Para vários vírus, a linha que delimita o seu espectro de hospedeiros parece ser mais epidemiológica do que biológica, ou seja, a restrição de alguns agentes aos seus hospedeiros naturais ocorreria mais por falta de oportunidade de

transmissão do que pela sua incapacidade de infectar outras espécies. Nesses casos, a barreira interespecies seria circunstancial e tênue e, por isso, potencialmente temporária. Exemplos de agentes virais que ultrapassam a barreira entre espécies e se tornam capazes de infectar novos hospedeiros têm sido cada vez mais freqüentes. Nesse sentido, acredita-se que mais de 70% das viroses emergentes em humanos teve origem zoonótica, tendo sido adquirida de animais em um passado mais ou menos recente. De especial interesse para a saúde humana e animal é a imensurável gama de agentes infecciosos existentes em animais silvestres. A história recente tem demonstrado que essa gama freqüentemente contempla populações humanas e de animais domésticos com novos vírus potencialmente patogênicos.

8 Bibliografia consultada

- ANDERSON, R.M.; MAY, R.M. Vaccination and herd immunity to infectious diseases. *Nature*, v.318, p.323-325, 1985.
- ASTUDILLO, V.M. *Encuestos por muestreo para estudios epidemiologicos en poblaciones animales*. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 1979. 60p.
- ASTUDILLO, V.M. et al. *Caracterizacion de los ecosistemas de la fiebre aftosa*. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1985. 91p.
- ATWELL, J.K. Veterinary services in emergencies: epizootic and zoonotic diseases. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.190, p.709-713, 1987.
- BAKER J.C. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea infection. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, v.9, p.25-41, 1990.
- BARRET, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology*, v.69, p.3-13, 1999.
- BINGHAM, J. Canine rabies ecology in Southern Africa. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p.1337-1341, 2005.
- CÔRTEZ, J.A. *Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais*. São Paulo: Varela, 1993. 227p.
- COYNE, M.J.; SMITH, G.; McALLISTER, F.E. Mathematical model for the population biology of rabies in raccon in the mid-Atlantic states. *American Journal of Veterinary Research*, v.50, p.2148-2153, 1989.
- CRAWFORD, P.C. et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, v.310, p. 482-485, 2005.
- CRUZ, M.H. et al. *Caracterizacion de la poblacion animal*. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 1979. p.72.
- DINTER, Z.; MOREIN, B. *Virus infections of ruminants*. New York, NY: Elsevier Science, 1990. 386p.
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary epidemiologic research*. Charlottetown, P.E.I.: AVC, 2003. 706p.
- FLINT, S.J. et al. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control*. Washington, DC: ASM, 2000. 804p.
- HALPIN, K. et al. Newly discovered viruses of flying foxes. *Veterinary Microbiology*, v.68, p.83-87, 1990.
- HAYES, E.B. et al. Epidemiology and transmission of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p.1167-1173, 2005.
- HUI, E. K-W. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microbes and Infection*, v.8, p.905-916, 2006.
- JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, p.79-95, 2003.
- KRUSE, H.; KIRKEMO, A-M; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, p. 2067-2072, 2004.
- MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. *Veterinary epidemiology: principles and methods*. Ames, Iowa: The Iowa State University Press, 1987. 343p.
- MIMS, C.A. Vertical transmission of viruses. *Microbiological reviews*, v.45, p. 267-286, 1981.
- MURPHY, F.A. et al. *Veterinary virology*. 3. ed. San Diego, CA: Academic, 1999. 629p.
- OSTLUND, E.N. The equine herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.9, p. 283-294, 1993.
- PARRISH, C.R. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, v.69, p.29-40, 1999.
- PENSAERT, M.B. *Virus infections of porcines*. Amsterdam: Elsevier, 1989. 283p.
- PETERSON, A.T.; BAUER, J.T.; MILLS, J.N. Ecologic and geographic distribution of filovirus disease. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, p.40-47, 2004.
- PLAGEMANN, P.G. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, p.903-908, 2003.
- POOM, L.L.M. et al. Isolation and characterization of a novel coronavirus in bats. *Journal of Virology*, v.79, p. 2001-2009, 2005.

- RICO-HESSE, R. et al. Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.5278-5281, 1995.
- RIJKS, J.M. et al. Phocine distemper outbreak, the Netherlands, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1945-1948, 2005.
- ROJAS, R.A. **Epidemiologia**. Buenos Aires: Intermédica, 1974, 190p.
- SCHUNRRERBERGER, P.R.; HUBBERT, W.T. **An outline of the zoonoses**. Ames, Iowa: The Iowa State University Press, 1981. 158p.
- SCHWABE, C.W. **Veterinary medicine and human health**. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 679p.
- SCHWABE, C.W.; RIEMANN, H.P.; FRANTI, C.E. **Epidemiology in veterinary practice**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. 303p.
- SMITH, R.D. **Veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC, 1995.
- SPICKLER, A.R.; ROTH, J.A. **Emerging and exotic diseases of animals**. 2. ed. Ames, IA: Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University College of Veterinary Medicine, 2004. 182p.
- STETTLER, M. et al. Determinants of persistence in canine distemper viruses. **Veterinary Microbiology**, v.57, p.83-93, 1997.
- STUDDERT, M.J. **Virus infections of equines** (virus infections of vertebrates s.). Amsterdam: Elsevier Science, 1996. 380p.
- THURSFIELD, M.V. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworth, 1986. 280p.
- TIMONEY, P.J. **Arteritis viral equina**. International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: < http://www.ivivs.org/special_book/lekeux/timoney/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso em: 20 mar. 2005.
- TORRES-VELEZ, F; BROWN, C. Emerging infections in animals: potential new zoonoses? **Clinics in Laboratory Medicine**, v.24, p.825-838, 2004.
- TRUYEN, U. et al. There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.103-122, 1995.
- VAN DER MEULEN, K.M.; PENSART, M.B.; NAUWYNCK, H.J. West Nile virus in the vertebrate world. **Archives of Virology**, v.150, p.637-657, 2005.
- WEAVER, S. C. et al. Genetic evidence for the origins of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB outbreaks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, p.441-8, 1999.
- WEBSTER, R.G. et al. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.3-8, 2006.
- WOLFE, N.D. Bushmeat hunting, deforestation and prediction of zoonotic disease emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1822-1827, 2005.
- WOOLHOUSE, M.E.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1842-1847, 2005.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES VÍRICAS

Eduardo Furtado Flores

11

1 Introdução	297
2 Aplicações do diagnóstico virológico	298
3 Propriedades das técnicas diagnósticas	299
4 Métodos de diagnóstico	299
4.1 Métodos diretos	302
4.1.1 Microscopia eletrônica	302
4.1.2 Isolamento e identificação	304
4.1.3 Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação	308
4.1.4 Detecção de antígenos	309
4.1.5 Detecção de ácidos nucleicos	311
4.2 Métodos indiretos – diagnóstico sorológico	314
4.2.1 Imunodifusão em ágar	316
4.2.2 Soro-neutralização	316
4.2.3 Inibição da hemaglutinação	317
4.2.4 ELISA	318
4.2.5 Imunofluorescência/imunoperoxidase	319
4.2.6 <i>Imunoblots</i>	320
4.2.7 Fixação do complemento	320
4.2.8 Outras técnicas sorológicas	320
5 Coleta e remessa de material	320
5.1 Eleição do material a ser coletado	321
5.2 Cuidados na coleta e acondicionamento	321
5.3 Conservação e remessa	322
5.4 Histórico	323
5.5 Fluxograma dos procedimentos de diagnóstico	323
5.6 Processamento das amostras	325
5.7 Interpretação dos resultados	325
6 Bibliografia consultada	326

1 Introdução

A elaboração do diagnóstico laboratorial das infecções víricas animais depende de ações coordenadas do veterinário de campo e dos técnicos de laboratório. Os resultados dos testes laboratoriais, isoladamente, possuem pouco significado se não forem interpretados à luz de conhecimentos de epidemiologia, patogenia e imunologia das doenças. Por isso, o diagnóstico laboratorial contribui com uma parte das informações necessárias à solução do problema sanitário sob investigação. A outra parte, necessariamente, deve ser provida pelos técnicos encarregados da investigação clínico-patológica e epidemiológica; e da coleta e remessa do material.

A coleta e acondicionamento adequados do material a ser examinado são críticos para o sucesso do diagnóstico laboratorial. Se as técnicas laboratoriais já apresentam dificuldades intrínsecas, a sua realização com material em condições impróprias dificulta a realização das técnicas e reduz a probabilidade de obter o diagnóstico correto. Por essa razão, amostras cuja coleta e acondicionamento tenham sido inadequados possuem um valor limitado para a realização do diagnóstico.

O material para exame deve ser acompanhado de um histórico clínico e epidemiológico detalhado. O histórico é importante para a formulação de hipóteses sobre os possíveis determinantes da doença e para o planejamento e direcionamento das técnicas e reagentes a serem empregados. Ou seja, grande parte da estratégia laboratorial de diagnóstico depende das informações que acompanham a amostra.

A elaboração do diagnóstico pode ser comparada com a montagem de um quebra-cabeça. As informações clínicas, patológicas e epidemiológicas colhidas a campo se constituem em parte das peças; e as informações obtidas com a realização das técnicas laboratoriais representam as peças restantes. Essa analogia ilustra bem a importância dos diferentes componentes do intrincado complexo de informações necessárias para a elucidação dos fatores que levam à ocorrência das doenças.

O número de agentes virais que causam doenças de importância sanitária e econômica em animais é muito grande. Isso torna virtualmente impossível que um único laboratório disponha de técnicas, reagentes e pessoal capacitado para o diagnóstico de todas as viroses. Por isso, existe uma tendência de laboratórios se especializarem em viroses de determinadas espécies animais. Esse direcionamento é, em grande parte, determinado pela demanda de serviços na sua região de abrangência.

Durante a realização do diagnóstico, deve-se considerar que agentes diferentes podem causar doenças semelhantes e que a elaboração do diagnóstico deve, necessariamente, considerar outros patógenos, tais como: bactérias, fungos e protozoários. Por isso, o encaminhamento do material para exame deve contemplar também as outras áreas da microbiologia.

Embora as técnicas clássicas de diagnóstico virológico (isolamento, microscopia eletrônica) continuem sendo utilizadas, a crescente demanda por diagnóstico em nível populacional tem impulsionado o desenvolvimento de técnicas rápidas, sensíveis e automatizáveis. O diagnóstico de um evento de doença determina, muitas vezes, as medidas de controle a serem adotadas. Nesses casos, a rapidez na obtenção dos resultados pode ser crítica para o sucesso da estratégia escolhida.

O desenvolvimento de *kits* diagnósticos para uso em clínicas e consultórios de pequenos animais tem auxiliado a difundir e popularizar o diagnóstico virológico como uma prática necessária para um adequado direcionamento da conduta do médico veterinário. Da mesma forma, técnicas de baixo custo e que podem ser automatizadas para uso em animais de interesse econômico têm sido incorporadas ao arsenal de técnicas já disponíveis. As técnicas moleculares também têm contribuído para a realização de diagnósticos mais rápidos, seguros e confiáveis, embora a utilização dessas técnicas ainda não esteja amplamente difundida.

A seguir serão abordados os aspectos gerais do diagnóstico laboratorial de infecções víricas, com enfoque para a aplicação das técnicas com

fins diagnósticos. A descrição detalhada das técnicas aqui abordadas foi apresentada no Capítulo 3, e a sua aplicação no diagnóstico individual das doenças será abordada nos capítulos específicos.

2 Aplicações do diagnóstico virológico

O diagnóstico laboratorial de infecções víricas possui aplicações muito mais amplas e abrangentes do que a de suporte à investigação clínica. Mesmo em enfermidades que possam ser diagnosticadas clinicamente e/ou com auxílio da histopatologia, a confirmação da etiologia por métodos virológicos e/ou sorológicos é recomendável e, em muitos casos, imprescindível.

A investigação clínica e epidemiológica de eventos de doença em indivíduos ou em populações frequentemente requer a complementação ou confirmação por técnicas laboratoriais. As variações na apresentação clínica das viroses, a ocorrência de síndromes distintas associadas com o mesmo agente ou, ainda, a ocorrência de manifestações clínicas semelhantes produzidas por diferentes vírus, fazem dos testes laboratoriais importantes recursos auxiliares ao diagnóstico clínico. Além disso, as infecções víricas frequentemente cursam sem sinais clínicos perceptíveis ou com sinais inespecíficos, tornando a confirmação laboratorial um requisito essencial para o seu diagnóstico.

Criações em diferentes níveis (propriedades, regiões, países e continentes) têm empregado esforços para erradicar e/ou evitar a introdução de doenças víricas de importância sanitária estratégica, como a febre aftosa, peste suína clássica e africana, doença de Aujeszky, influenza aviária, entre outras. Nesses casos, a existência de um sistema integrado e ágil de monitoramento, capaz de detectar e identificar esses agentes rapidamente, constitui-se em uma ferramenta essencial para a manutenção da condição sanitária dessas criações.

As zoonoses víricas, como a raiva, influenza H5N1, hantavirose, febres hemorrágicas, febre amarela, encefalomyelites equinas, doença do Nilo Ocidental, entre outras, possuem grande importância em saúde pública, o que justifica a manutenção de sistemas integrados e contínuos de vigilância

e diagnóstico nas regiões endêmicas ou de risco. O monitoramento constante da evolução genética dos vírus da influenza, que infectam aves aquáticas e migratórias, tem fornecido informações importantes sobre o potencial zoonótico desses vírus e também tem direcionado a elaboração de vacinas e a adoção de medidas preventivas. O acompanhamento da história natural de outros vírus zoonóticos, como o coronavírus causador da SARS, o vírus ebola e os paramixovírus Nipah, Menangle e Hendra também se baseia na disponibilidade de métodos virológicos de diagnóstico.

A comercialização, especialmente internacional, de animais de interesse econômico geralmente requer a certificação de que esses animais são livres de infecções persistentes ou latentes, como as infecções pelo vírus da leucose bovina (BLV), herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), vírus da língua azul (BTV), vírus da doença de Aujeszky (PRV), vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), entre outras. O mesmo ocorre com animais enviados a feiras, exposições, centrais de coleta de sêmen e hipódromos. Em áreas endêmicas, o mais comum é que as propriedades que comercializam reprodutores erradiquem essas infecções e obtenham a certificação oficial. Para isso, é necessário um sistema de diagnóstico efetivo, capaz de identificar os animais infectados e certificar as propriedades ou áreas livres do agente. Da mesma forma, os reprodutores e/ou sêmen destinados à comercialização devem ser testados e certificados livres de determinados agentes.

Em infecções por retrovírus (BLV, EIAV, vírus da artrite e encefalite caprina [CAEV]) e por herpesvírus (BoHV-1/5, PRV), entre outras, é possível reduzir gradativamente a prevalência da infecção e, eventualmente, erradicar o agente através de programas de identificação e remoção dos animais soropositivos. Para isso, é necessário um sistema efetivo e sistemático de diagnóstico, aliado a políticas públicas ou privadas que viabilizem o descarte dos animais e a indenização dos proprietários, medidas frequentemente adotadas nesses programas.

O estabelecimento de programas de sanidade animal depende do conhecimento das enfermidades prevalentes em uma determinada região. Portanto, estudos epidemiológicos para

determinar a ocorrência, prevalência e distribuição de enfermidades víricas específicas são frequentemente realizados e utilizam testes diagnósticos, principalmente testes sorológicos.

A decisão de se adotar medidas de controle e/ou erradicação de doenças víricas depende do conhecimento prévio sobre a situação da respectiva infecção na população. Este conhecimento pode ser obtido por estudos soro-epidemiológicos que fazem parte de um estudo descritivo inicial, denominado *diagnóstico de situação*. A tomada de decisões, a natureza das medidas adotadas e avaliações periódicas do andamento e sucesso de programas de controle também dependem dos resultados obtidos em testes diagnósticos.

As aplicações do diagnóstico virológico laboratorial são amplas e abrangentes e contemplam desde investigações clínicas em nível individual até programas de controle e erradicação de doenças em nível nacional ou continental. Por essa razão, as técnicas de diagnóstico estão sob contínuo aperfeiçoamento para contemplar os diferentes graus de exigência. Novas técnicas – e variações de técnicas já existentes – são relatadas continuamente em publicações especializadas e muitas delas acabam sendo incorporadas ao arsenal de técnicas disponíveis para o diagnóstico de viroses animais.

3 Propriedades das técnicas diagnósticas

A aplicação de uma determinada técnica laboratorial em diagnóstico requer o preenchimento de alguns requisitos básicos. A técnica deve possuir predicados como sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade (ou praticidade), reprodutibilidade, automatização e custo baixo (Figura 11.1). *Sensibilidade* refere-se à capacidade da técnica de detectar quantidades mínimas do agente ou de seus produtos. Como frequentemente a quantidade de vírus (ou antígenos) presente nas amostras clínicas é muito pequena, as técnicas devem ser suficientemente sensíveis para detectá-los. Em nível populacional, a sensibilidade se refere à capacidade de detecção de um número maior ou menor dos indivíduos que são realmente positivos. *Especificidade* refere-se à capacidade

da técnica de identificar um determinado vírus e, simultaneamente, distingui-lo de outros agentes, mesmo que sejam muito semelhantes. A *rapidez* de obtenção do diagnóstico é essencial, pois, muitas vezes, o resultado determina as medidas a serem adotadas. A confiabilidade de qualquer teste diagnóstico depende também da sua *repetibilidade* (ou reprodutibilidade), ou seja, da consistência dos resultados obtidos pela repetição de sua execução. Para possuírem utilização na rotina, as técnicas devem também ser *simples* e *práticas* de executar, de preferência *automatizáveis* para possibilitar o teste simultâneo de um grande número de amostras. Além disso, devem apresentar um *custo baixo*, sobretudo, para o diagnóstico de enfermidades de animais de interesse econômico e, quando necessário, o teste de um número grande de amostras.

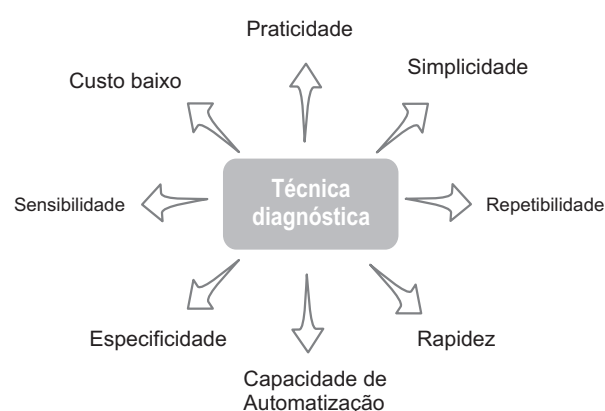


Figura 11.1. Propriedades desejáveis nos testes diagnósticos.

4 Métodos de diagnóstico

Os métodos de diagnóstico virológico podem ser classificados em diretos e indiretos. Os *métodos diretos* são utilizados para detectar o vírus, antígenos ou ácidos nucleicos virais. A detecção pode ser realizada diretamente em amostras clínicas ou após a multiplicação do agente em cultivos celulares, ovos embrionados ou animais susceptíveis. Os *métodos indiretos* detectam anticorpos específicos contra o vírus, isto é, detectam a resposta do hospedeiro à infecção e, por isso, a sua denominação.

Dentre as técnicas diretas, destaca-se a *microscopia eletrônica* (ME) que permite a visualização de partículas víricas diretamente no material clínico ou após a multiplicação do agente em cultivo celular. Esse método é rápido e permite a identificação de partículas víricas viáveis e também inviáveis. No entanto, a técnica exige equipamento caro e pessoal altamente treinado, é aplicável somente a alguns vírus e não possui boa sensibilidade.

O *isolamento em cultivo celular* (ICC) permanece sendo o método mais utilizado para investigar a presença de vírus em material clínico. Após a multiplicação em células de cultivo, o vírus pode ser identificado pela produção de efeito citopático (ECP) característico ou pela detecção de antígenos ou ácidos nucleicos nas células infectadas, ou, ainda, por neutralização com soro imune específico. O ICC é um dos métodos mais sensíveis de detecção de vírus, porém a demora na obtenção dos resultados se constitui na sua principal restrição em relação a outros métodos. Uma das vantagens do método é a obtenção do vírus viável, o que permite a sua caracterização e estudos posteriores.

A inoculação de *ovos embrionados* (OE) ou de *animais susceptíveis* já foi amplamente utilizada para o diagnóstico e detecção de vírus. No entanto, atualmente esse método possui aplicação restrita a poucos vírus e a algumas situações específicas. Métodos que se utilizam da capacidade hemaglutinante (*hemaglutinação*) ou hemadsorvente (*hemadsorção*) de alguns vírus também têm sido utilizados em diagnóstico virológico, porém são aplicáveis somente a um grupo restrito de agentes.

A *detecção de antígenos virais* pelo uso de anticorpos específicos é um dos métodos mais utilizados para a detecção e identificação de vírus. A detecção pode ser realizada em amostras clínicas (secreções, sêmen, sangue, urina, fezes etc.), tecidos (obtidos por biópsia ou necropsia) ou em células de cultivo após a multiplicação do agente. As técnicas de *imunofluorescência* (IFA) e *imunoperoxidase* (IPX) têm sido amplamente utilizadas em diagnóstico, sobretudo, pela boa sensibilidade, especificidade, rapidez, custo baixo e facilidade de execução. O desenvolvimento de *kits*

diagnósticos para uso em consultórios, clínicas veterinárias ou mesmo a campo popularizaram essas técnicas e ampliaram o seu uso. A detecção de antígenos através de métodos imunoenzimáticos (ELISA), imunocromatográficos e *immunoblot* (*Western/dot blot*) também tem se popularizado ultimamente e somaram-se à IFA e IPX como técnicas importantes de diagnóstico.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de técnicas moleculares contribuiu de forma notável para o diagnóstico de enfermidades infecciosas. Técnicas de detecção de ácidos nucleicos através de *hibridização* (*Southern, Northern, dot/slot blot*) e reação da polimerase em cadeia (PCR) são muito sensíveis e específicas, permitindo uma identificação rápida e segura do ácido nucleico viral em amostras clínicas. A substituição dos isótopos radioativos por substâncias não-radioativas para a marcação das sondas moleculares também contribuiu para a popularização e difusão dessas técnicas. A adaptação da PCR para o diagnóstico rápido a campo (PCR em tempo real) ampliou as perspectivas para o diagnóstico aplicado à investigação de infecções víricas de importância sanitária estratégica. Os métodos diretos de diagnóstico virológico estão apresentados na Figura 11.2

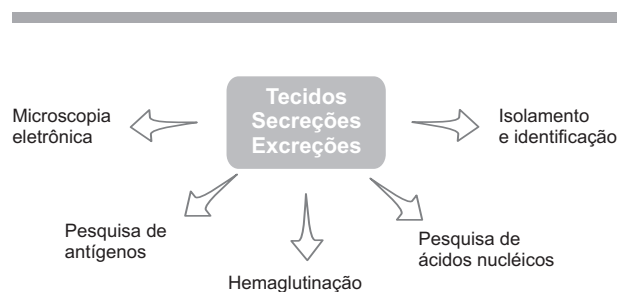


Figura 11.2. Métodos de detecção de vírus ou produtos virais em amostras clínicas.

A detecção de anticorpos antivirais no soro ou em secreções (leite, colostro) também é amplamente utilizada em técnicas de diagnóstico. Esse procedimento se constitui em método *indireto*, pois detecta os produtos da reação do organismo animal contra o agente. As técnicas de detecção de anticorpos, também chamadas de *testes sorológicos*, possuem aplicação ampla em estudos epi-

demiológicos, sobretudo, quando o objetivo é a determinação da prevalência e distribuição de infecções víricas em populações. Dentre as técnicas sorológicas, destacam-se a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ELISA, soroneutralização (SN), fixação do complemento (FC) e inibição da hemaglutinação (HI).

O significado da sorologia para o diagnóstico varia de acordo com a biologia de cada vírus. Por isso, os resultados dos exames sorológicos

devem ser interpretados à luz dos conhecimentos sobre a biologia e epidemiologia do agente e da resposta imunológica do hospedeiro. Detalhes sobre a interpretação dos resultados de exames sorológicos para diferentes vírus serão abordados na seção 4.2.

Os principais métodos diretos e indiretos de diagnóstico, com o seu princípio, propriedades, restrições e aplicações estão apresentados nas Tabelas 11.1 e 11.2, respectivamente.

Tabela 11.1. Princípios, propriedades e restrições dos principais métodos diretos de diagnóstico virológico

Método	Princípio	Propriedades	Restrições	Aplicações
Microscopia eletrônica	Visualização das partículas víricas coradas com metais pesados em um microscópio	<ul style="list-style-type: none"> – Rápida (poucas horas); – Detecta vírions viáveis e inviáveis; – Útil para vírus que não replicam em cultivo; – Pode permitir a identificação do agente. 	<ul style="list-style-type: none"> – Equipamento caro; – Exige pessoal treinado; – Baixa sensibilidade; – Aplicação restrita a alguns vírus. 	<ul style="list-style-type: none"> – Infecções entéricas (rotavírus, coronavírus, astrovírus); – Infecções cutâneas (poxvírus, herpesvírus).
Isolamento em cultivo celular	Observação do efeito citopático e/ou detecção de produtos virais após a sua multiplicação em células de cultivo.	<ul style="list-style-type: none"> – Sensível; – O agente fica disponível para estudos posteriores; – Implementação e execução relativamente simples. 	<ul style="list-style-type: none"> – Demorado (até semanas); – Não aplicável a alguns vírus; – Somente detecta vírus que estejam viáveis; – Contaminação bacteriana e fúngica; – Contaminação com vírus adventícios. 	<ul style="list-style-type: none"> – Todos os vírus que replicam em cultivos celulares; – Qualquer material clínico pode ser submetido ao isolamento.
Hemaglutinação (HA)	Observação da capacidade do vírus de aglutinar eritrócitos.	<ul style="list-style-type: none"> – Rápida; – Boa sensibilidade; – Boa especificidade; – Fácil execução. 	<ul style="list-style-type: none"> – Aplicável ao um grupo restrito de vírus; – Hemaglutinação inespecífica; – Necessidade de espécies doadoras de hemácias; – Não automatizável. 	<ul style="list-style-type: none"> – Aplicável aos vírus hemaglutinantes de aves e mamíferos (ver tabela no capítulo 3); – Fluidos corporais, suspensões de tecidos.
Imunofluorescência (IFA). Imunoperoxidase (IPX).	Proteínas virais são detectadas por anticorpos específicos conjugados com um marcador fluorescente (IFA) ou com uma enzima (IPX).	<ul style="list-style-type: none"> – Rápida (minutos ou poucas horas); – Simples, baixo custo; – Boa sensibilidade e especificidade; – Detecta também vírus inviável; – Pode informar sobre sorotipos; – Disponível em kits; – Aplicável a virtualmente todos os vírus. 	<ul style="list-style-type: none"> – Equipamento caro (IFA); – Reações inespecíficas (uso de anticorpos policlonais); – Reagentes para alguns vírus podem não ser disponíveis. 	<ul style="list-style-type: none"> – Aplicável a qualquer vírus para o qual se disponha de anticorpos específicos; – Materiais: tecidos (frescos, congelados, fixados), esfregaços (sangüíneos, de secreções), células de cultivo.
Testes imunoenzimáticos/cromatográficos	A presença do antígeno que reage com o anticorpo específico imobilizado ou após migração, é revelada pela mudança de cor.	<ul style="list-style-type: none"> – Simples e prática; – Disponível em kits; – Rápida; – Boa sensibilidade e especificidade. 	<ul style="list-style-type: none"> – Não automatizável; – Especificidade e sensibilidade podem deixar a desejar; – Custo alto por amostra. 	<ul style="list-style-type: none"> – Aplicável a vários vírus de pequenos animais; – Kits disponíveis para uso em clínicas; – Também para alguns vírus de aves, suínos e bovinos.
Detecção de ácidos nucleicos (PCR, hibridização).	Ácidos nucleicos (RNA, DNA) do vírus são detectados por sondas marcadas (hibridização) ou após amplificação por reações enzimáticas (PCR).	<ul style="list-style-type: none"> – Específica; – Sensível; – Necessita quantidades mínimas da amostra; – Potencialmente aplicável a todos os vírus; – Rápida (PCR); – Automatizável (PCR). 	<ul style="list-style-type: none"> – Custo alto; – Requer equipamento e pessoal treinado; – Técnica sofisticada. 	<ul style="list-style-type: none"> – Aplicável a virtualmente todos os vírus conhecidos; – Pode ser realizada em qualquer amostra clínica.

Fonte: adaptada de Murphy et al. (1999).

Tabela 11.2. Princípios, propriedades e restrições dos principais métodos indiretos de diagnóstico virológico

Método	Princípio	Propriedades	Restrições	Aplicações
Imunodifusão em ágar (IDGA)	Observação de linhas de precipitação no ágar, produzidas pela formação de complexos antígeno-anticorpos.	<ul style="list-style-type: none"> – Simples execução e implementação; – Custo baixo; – Sensibilidade razoável; – Resultados em 24-72 h. 	<ul style="list-style-type: none"> – Reações inespecíficas frequentes; – Sensibilidade limitada; – Qualidade do antígeno é crítica; – Somente qualitativa (não permite a quantificação dos anticorpos). 	<ul style="list-style-type: none"> – Anemia infecciosa equina, língua azul, leucose enzoótica bovina.
Soroneutralização (SN)	Anticorpos presentes no soro previnem a replicação do vírus e a produção de efeito citopático nos cultivos.	<ul style="list-style-type: none"> – Sensível; – Específica; – Custo reduzido; – Qualitativa (sim/não) e quantitativa (título de anticorpos); – Similar à neutralização <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> – Exige cultivos celulares; – Implementação/execução podem ser problemáticas; – Contaminação bacteriana; – Toxicidade do soro; – Detecta somente anticorpos neutralizantes. 	<ul style="list-style-type: none"> – Virtualmente todos os vírus que replicam em cultivo celular.
ELISA	Anticorpos presentes no soro ligam-se aos antígenos imobilizados em placas de poliestireno e são detectados por anti-anticorpos conjugados com enzimas.	<ul style="list-style-type: none"> – Rápida (2-3 h); – Sensível; – Específica; – Automatizável; – Disponível em kits; – Pode detectar classes específicas (IgG, IgM etc.). 	<ul style="list-style-type: none"> – Requer equipamento; – Kits comerciais podem ter custo alto; – Não disponível para todos os vírus; – Qualidade do antígeno é crítica. 	<ul style="list-style-type: none"> – Utilizada para inúmeros vírus; – Pode ser qualitativa e quantitativa; – Utilizada para detectar anticorpos totais ou classes específicas no soro ou secreções (leite); – Variações da técnica são disponíveis para a detecção de antígenos.
Inibição da hemaglutinação (HI).	Anticorpos antivirais impedem a atividade hemaglutinante do vírus.	<ul style="list-style-type: none"> – Rápida; – Sensível; – Específica; – Custo baixo. 	<ul style="list-style-type: none"> – Somente aplicável a vírus hemaglutinantes; – Requer animais doadores de eritrócitos; – Inibidores inespecíficos podem dar falso positivo; – Não-automatizável. 	<ul style="list-style-type: none"> – Vírus hemaglutinantes de aves e mamíferos (ver tabela capítulo 3).
Fixação do Complemento.	A presença de anticorpos leva à ativação do complemento e lise de eritrócitos.	<ul style="list-style-type: none"> – Boa sensibilidade e especificidade. 	<ul style="list-style-type: none"> – Demorada; – Trabalhosa; – Não automatizável; – Requer animais doadores de eritrócitos. 	<ul style="list-style-type: none"> – Já foi muito usada para vários vírus, atualmente está em desuso.
Imunofluorescência (IFA) para anticorpos.	Anticorpos presentes no soro se ligam em antígenos específicos imobilizados e são detectados por anticorpos marcados com FITC.	<ul style="list-style-type: none"> – Rápida; – Boa sensibilidade; – Simples. 	<ul style="list-style-type: none"> – Reações inespecíficas; – Exige microscópio de UV; – Pode não detectar níveis baixos de anticorpos; – Não automatizável. 	<ul style="list-style-type: none"> – Já foi usada para vários vírus; – Uso atual restrito a alguns vírus.
Imunocromatografia	A presença do anticorpo que reage com o antígeno é revelada pela mudança de cor.	<ul style="list-style-type: none"> – Simples e prática; – Disponível em kits; – Rápida; – Boa sensibilidade e especificidade. 	<ul style="list-style-type: none"> – Não automatizável; – Especificidade e sensibilidade podem deixar a desejar; – Custo individual alto. 	<ul style="list-style-type: none"> – Aplicável a vários vírus de pequenos animais; – Kits disponíveis para uso em clínicas; – Também para alguns vírus de aves, suínos e bovinos.

Fonte: adaptada de Murphy et al. (1999).

4.1 Métodos diretos

4.1.1 Microscopia eletrônica

A técnica de microscopia eletrônica (ME) permite a visualização das partículas víricas em material clínico ou após a sua amplificação em cultivo celular (Figura 11.3). A simples observação das características morfológicas dos vírions

(morfologia, diâmetro, estrutura do capsídeo e envelope), aliada com a sua distribuição no material examinado (núcleo ou citoplasma), permite, algumas vezes, a identificação definitiva do agente. Por isso, a ME constitui-se em um dos métodos mais notáveis de diagnóstico de infecções víricas. O método é particularmente útil para infecções entéricas (rotavírus, coronavírus,

astrovírus), cutâneas (poxvírus, herpesvírus) e também para a identificação de vírus de difícil multiplicação em cultivo celular (torovírus, hepadnavírus, circovírus, alguns adenovírus, astrovírus, coronavírus e rotavírus).

O diâmetro, a morfologia dos vírions e detalhes da sua superfície são os aspectos principais observados no diagnóstico por ME. Essas características variam muito entre as famílias de vírus, mas são pouco variáveis entre vírus de um mes-

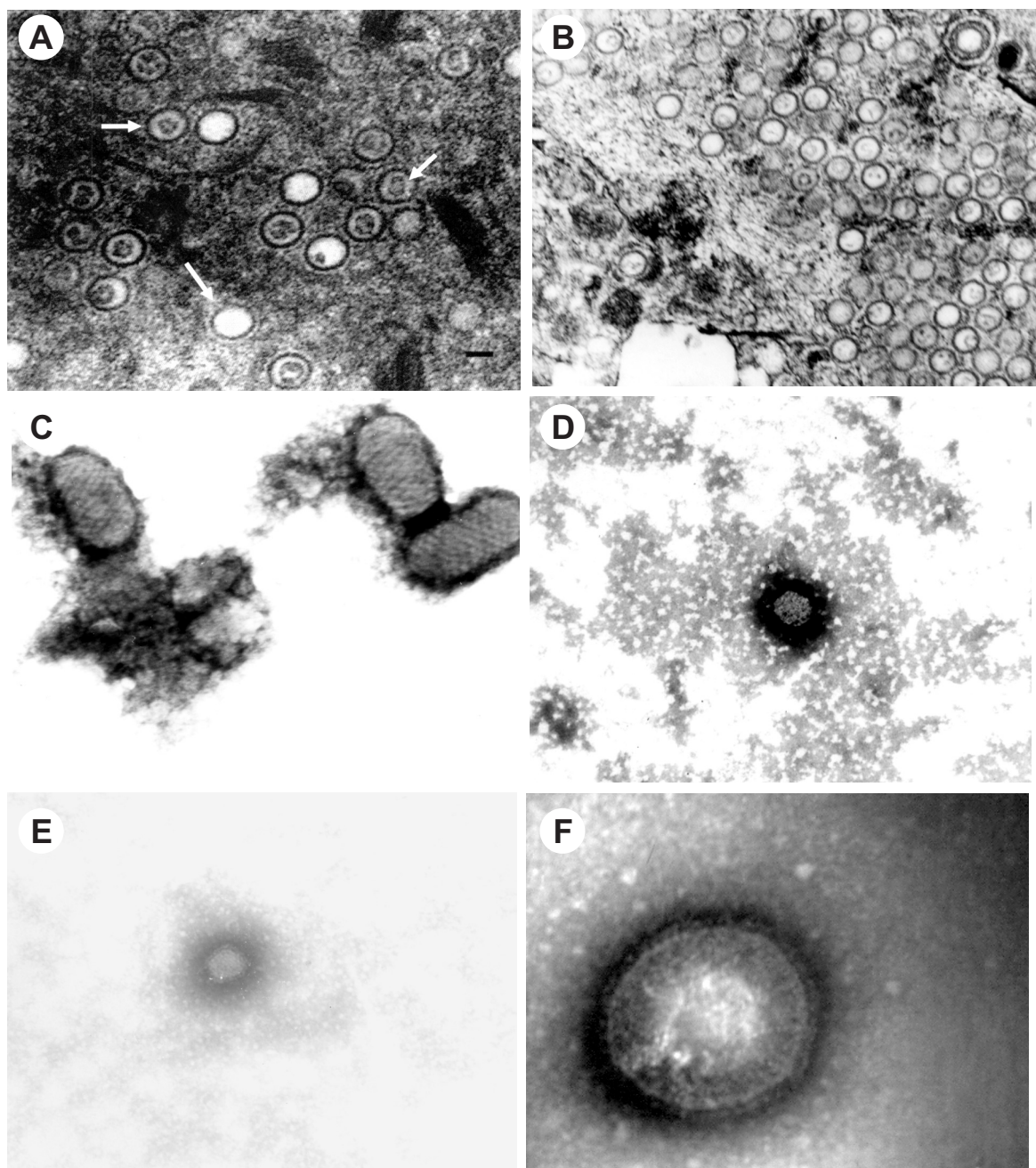


Figura 11.3. Fotos de microscopia eletrônica de material enviado para diagnóstico virológico. A) Biópsia de pele de glândula mamária de vacas com mamilite. Partículas típicas de herpesvírus (setas) (magnificação 60.000x); B) Células de cultivo inoculadas com macerado de cérebro de bezerros com doença neurológica. Partículas víricas envelopadas típicas de herpesvírus (42.000x); C) Crostas na junção mucocutânea oral de ovinos com doença vesicular-crostosa. Partículas típicas de parapoxvírus (100.000x). D) Fezes de bezerro com diarreia. Partícula de 75-80 nm semelhante a rotavírus (75.000x); E) Fezes de bezerro com diarreia. Partícula envelopada com aproximadamente 80 nm, sugestiva de coronavírus (120.000x). F) Sobrenadante de cultivo inoculado com secreções nasais de bezerros com doença respiratória. Partícula envelopada semelhante a herpesvírus (260.000x).

mo gênero ou espécie. No entanto, alguns vírus são de difícil visualização e detecção através da ME, devido a sua morfologia pouco definida (podendo ser confundidos com estruturas celulares) ou pela baixa concentração de partículas víricas no material. Isso faz com que a ME não possua aplicabilidade universal.

Dentre as amostras clínicas mais comumente submetidas à ME estão o material fecal (fezes ou conteúdo intestinal), fluidos ou escaras de lesões cutâneas ou mucosas, tecidos coletados na necropsia, células ou sobrenadante de cultivos previamente inoculadas com o material suspeito. A realização de ME em tecidos de animais infectados também pode indicar o local da célula onde ocorre a replicação do vírus, podendo fornecer informações sobre a patogenia dessas infecções. Quando a concentração mínima requerida para a visualização das partículas não é atingida (aproximadamente 10^6 partículas virais por mL de fluido ou por grama do material), pode-se realizar a ultracentrifugação do material para concentrar os vírions. O uso de anticorpos específicos conjugados com micropartículas de ouro (técnica de *immunogold*) aumenta a probabilidade de detecção e visualização do agente. Como a ME requer grande quantidade de vírus para poder detectá-lo, resultados negativos nessa técnica não indicam necessariamente a ausência de vírus na amostra.

Dentre as propriedades deste método destacam-se a rapidez de execução, a possibilidade de reconhecimento da morfologia viral (às vezes, a identificação da família e espécie do vírus) e a possibilidade de detecção de vírus viáveis e também aqueles que eventualmente já estejam inviáveis no material submetido. A ME também é muito útil para detectar vírus que não replicam eficientemente em cultivo celular. As maiores restrições referem-se a sua baixa sensibilidade, aplicabilidade restrita a alguns vírus, equipamento caro e necessidade de pessoal altamente treinado. A Figura 11.3 apresenta fotografias de ME obtidas pelo exame de amostras clínicas e cultivos celulares inoculados com o material suspeito.

4.1.2 Isolamento e identificação

Apesar do desenvolvimento de técnicas modernas e sofisticadas de diagnóstico, a identifica-

ção de vírus, após o seu isolamento em cultivo celular, continua sendo o método direto mais utilizado em diagnóstico virológico. Também é o método mais fascinante utilizado em Virologia, pois permite a obtenção do agente viável para estudos posteriores. O isolamento em ovos embrionados somente é aplicável para alguns vírus; já o isolamento em animais de laboratório encontra-se atualmente em desuso e possui aplicação muito restrita.

4.1.2.1 Isolamento em cultivo celular

Como os vírions freqüentemente estão presentes em pequenas quantidades no material clínico, a inoculação em células susceptíveis permite a sua multiplicação para posterior identificação. Além do uso em diagnóstico, a multiplicação de vírus em cultivos celulares é muito utilizada com diversas finalidades em laboratórios de virologia, ou seja, os cultivos celulares são instrumentos indispensáveis à prática virológica. A maior restrição para a utilização do isolamento com fins diagnósticos é o tempo necessário para se obter o resultado final – pode levar até semanas.

O ICC é aplicável a maioria dos vírus de interesse veterinário e possui boa sensibilidade. O material suspeito é inoculado em células animais cultivadas *in vitro* e a replicação do vírus é evidenciada pela produção de efeito citopático (ECP) ou pela detecção de proteínas ou ácidos nucléicos virais nas células inoculadas.

O material enviado ao laboratório deve ser acompanhado de um histórico clínico que permita a formulação de hipóteses sobre os vírus suspeitos. Isto facilita a tomada de decisão com relação ao tipo de célula e da técnica utilizada para a identificação, por exemplo, em casos de doença respiratória de bovinos, quatro agentes virais estão associados com maior freqüência: BoHV-1, vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da parainfluenza 3 (bPI-3) e vírus sincicial respiratório bovino (BRSV). Portanto, o procedimento a ser adotado deverá ser direcionado para a detecção desses agentes. O material deverá ser inoculado em cultivos celulares que sejam susceptíveis aos quatro agentes para que, se algum deles esti-

ver presente no material, possa se multiplicar e ser identificado.

A escolha das células é crítica para o sucesso do procedimento. Em geral, células primárias são mais sensíveis para o isolamento do que linhagens celulares. Apesar disso, muitos laboratórios utilizam linhagens celulares pela facilidade de manutenção e multiplicação mais eficiente. Como regra, deve-se preferir células da espécie animal de origem do material. Amostras oriundas de bovinos devem ser inoculadas em células de origem bovina, e assim por diante. Alguns vírus são estritamente espécie-específicos e somente se multiplicam em células da espécie homóloga; outros são capazes de replicar em células de diferentes espécies (o BVDV, por exemplo, replica em células de bovinos, ovinos, suínos, carnívoros, primatas etc.). Poucos vírus se multiplicam bem somente em células de outras espécies. O vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) replica eficientemente em células da linhagem MARC-145, de origem primata; os herpesvírus eqüinos são amplificados nas linhagens VERO (de primatas) e RK-13 (coelho); os vírus da influenza de eqüinos e humanos se multiplicam bem na linhagem MDCK (canina). Esses exemplos representam exceções. As células utilizadas para o isolamento e multiplicação dos principais vírus animais e o ECP produzido por esses vírus estão apresentados na Tabela 3.3 (Capítulo 3).

Os materiais mais freqüentemente enviados para a detecção de vírus são fragmentos de tecidos (coletados em necropsias ou de fetos abortados), secreções (leite, secreções nasais, vaginais, prepúciais, sêmen), fezes, conteúdo intestinal ou uterino, líquido de vesículas, soro e sangue integral. Previamente à inoculação, cada material é submetido a um determinado procedimento, que pode incluir maceração e homogeneização (tecidos); centrifugação para a remoção de sujidades (secreções) ou para a separação dos leucócitos (sangue integral); ou filtração para a remoção de bactérias e outros contaminantes (fezes, conteúdo intestinal).

Os cultivos celulares são inoculados com o material suspeito e devem ser monitorados diariamente para o aparecimento de alterações morfológicas que caracterizam o ECP. O não aparecimento de ECP ao final de 4 a 5 dias deve

ser seguido da reinoculação do sobrenadante do cultivo em cultivos frescos (subcultivados 18 a 24 h antes). Cada etapa de inoculação e monitoramento, que leva entre 4 e 5 dias, é denominada *passagem*. Para alguns vírus, previamente à reinoculação, recomenda-se proceder três ciclos de congelamento e descongelamento rápido do material, para provocar a ruptura das células e a liberação dos vírions intracelulares. O material é, então, centrifugado à baixa rotação, o sedimento é desprezado e o sobrenadante é inoculado em um novo cultivo. A maioria dos protocolos recomenda a realização de três passagens antes de considerar o material negativo. A necessidade da realização dessas passagens é explicada pelo fato de que alguns vírus de campo replicam lentamente em cultivo. Além disso, a quantidade de vírus viável no material original pode ser muito pequena, sendo necessária uma amplificação substancial que permita a visualização do ECP.

A replicação da maioria dos vírus animais em cultivo celular produz ECP característico do seu gênero ou espécie. Esses vírus são denominados citopáticos (ou citopatogênicos, CP). Por isso, com freqüência, é possível identificar o agente viral pelo tipo de ECP produzido, aliado com o histórico clínico-patológico. Os ECPs produzidos pelos principais vírus animais estão apresentados na Tabela 3.3 (Capítulo 3). As características do ECP podem apresentar variações entre diferentes isolados do vírus e entre diferentes células. Alguns vírus apresentam replicação rápida e produzem ECP bem pronunciado e característico. Outros replicam lentamente e produzem um ECP pouco evidente e nem sempre reconhecível. Quando não há a produção de ECP, ou quando este não é característico, é necessária a identificação do agente pelo uso de técnicas de detecção de antígenos (IFA ou IPX). O agente detectado pela produção de ECP pode também ser identificado por neutralização com anti-soro específico. A identificação de alguns vírus, após a produção de ECP, pode ser realizada também por ME. Uma minoria de vírus não produz citopatologia, sendo denominados não-citopáticos (ncp, exemplos: circovírus suíno, BVDVncp). Nesses casos, a execução de técnicas de detecção de antígeno ou de ácidos nucleicos é indispensável para a detecção e identificação do agente.

O isolamento de vírus em cultivo a partir de material clínico apresenta algumas dificuldades, como a toxicidade do material e contaminação bacteriana ou fúngica. A toxicidade de materiais, como o sêmen, pode ser reduzida pela sua diluição em meio de cultivo ou em soro fetal bovino (sêmen); a contaminação das fezes pode ser minimizada pela filtração ou por centrifugação previamente à inoculação, além do uso de antibióticos e antifúngicos no meio de cultivo. Outros fatores que influenciam o sucesso do ICC são: a coleta, conservação e remessa adequadas do material. Como o método detecta apenas partículas víricas viáveis, e, portanto, capazes de replicar em cultivo, determinadas temperaturas, pH e exposição a condições ambientais que sejam prejudiciais à viabilidade do agente podem afetar negativamente o teste. O material a ser submetido deve ser mantido sob refrigeração (ou congelado) até a submissão ao laboratório, para preservar a viabilidade do vírus. As recomendações para a coleta e remessa de material para diagnóstico virológico encontram-se ao final deste capítulo.

O protocolo para o isolamento e identificação de vírus em cultivo celular está ilustrado na Figura 11.4.

4.1.2.2 Isolamento em ovos embrionados

Os tecidos de embriões de galinha representam sistemas ideais para a multiplicação de vários vírus. Por isso, ovos embrionados têm sido utilizados para o isolamento e também para o cultivo de alguns vírus de aves e de mamíferos. Dependendo do vírus suspeito, o material pode ser inoculado por diversas vias e em diferentes estágios de desenvolvimento do embrião. Após a inoculação, a viabilidade do embrião é monitorada diariamente em um ovoscópio. Em caso de morte, realiza-se a necropsia do embrião à busca de alterações macroscópicas. A identificação do agente pode requerer a realização de outros testes (hemaglutinação, detecção de antígenos e/ou ácidos nucleicos virais) em material coletado do embrião.

As principais propriedades desse método são: boa sensibilidade, facilidade de manipulação e custo relativamente baixo. As maiores restrições se referem à dificuldade de obtenção de ovos embrionados livres de patógenos, contaminação bacteriana e/ou fúngica e impossibilidade de automação. Além disso, a sua aplicação é restrita aos vírus que se multiplicam em embriões

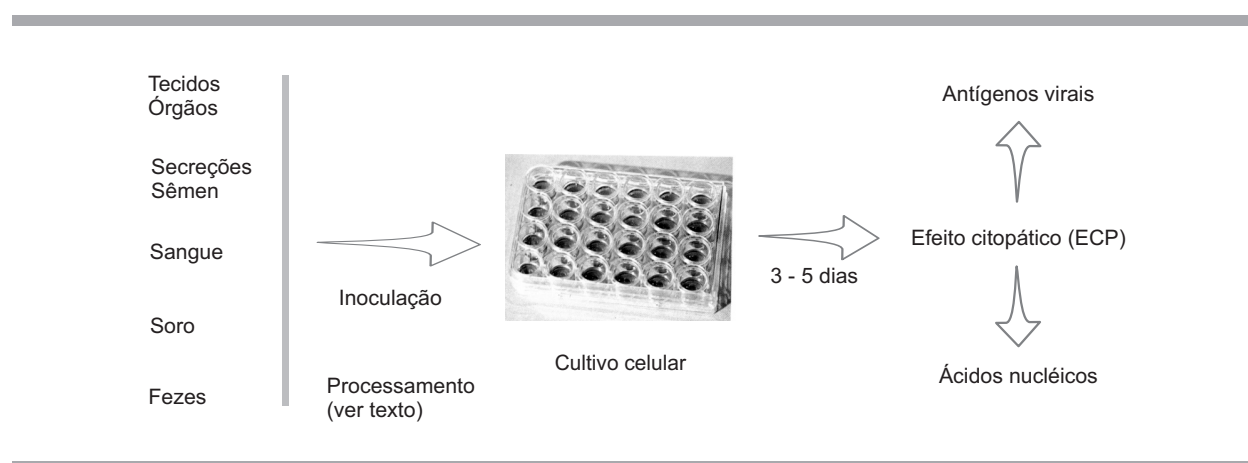


Figura 11.4. Protocolo para isolamento e identificação de vírus pela inoculação em cultivo celular. As amostras são inicialmente processadas e inoculadas em células susceptíveis aos vírus suspeitos. Os cultivos são monitorados por alguns dias para o aparecimento de efeito citopático (ECP). Ao final da terceira passagem do material ou quando aparecer ECP os cultivos são submetidos à identificação do agente por técnicas de detecção de antígeno ou de ácidos nucleicos. A presença de vírus não-citopáticos deve ser monitorada por IFA ou IPX. Deve-se proceder três passagens do material antes de considerá-lo negativo para vírus.

de galinha. Na Tabela 3.2 (Capítulo 3), estão listados os vírus que replicam em ovos embrionados, as vias de inoculação e as alterações produzidas nos embriões.

4.1.2.3 Isolamento em animais

Com o advento dos cultivos celulares, a inoculação de animais para o diagnóstico de infecções por vírus foi sendo gradativamente substituída. Além das questões operacionais (custo, espaço, dificuldade de manutenção de animais com este propósito), o uso de animais tem sido restrito por questões éticas. No entanto, esse método ainda possui aplicação em alguns casos específicos, geralmente associados com outras técnicas de diagnóstico. Em casos suspeitos de raiva, pesquisa-se inicialmente a presença de antígenos em fragmentos de cérebro por IFA. Este teste é seguido pela inoculação de um macerado do cérebro suspeito em camundongos lactentes (6-10 dias de idade), o que constitui a *prova biológica*,

permitindo o diagnóstico definitivo da enfermidade. Os camundongos são inoculados pela via intracerebral com o material suspeito e monitorados por até 28 dias. A presença do vírus rábico no material resulta no desenvolvimento de doença neurológica severa e morte entre o 8 e 21 dias após a inoculação. A confirmação da identidade do agente pode ser realizada por imunofluorescência do cérebro dos camundongos que morreram. O protocolo padrão para o diagnóstico da raiva está ilustrado na Figura 11.5.

A encefalite eqüina venezuelana (VEE), causada por um alfavírus, além de infecções neurológicas causadas por alguns flavivírus, também pode ser diagnosticadas pela inoculação intracerebral do material suspeito em camundongos lactentes. A inoculação de camundongos também é realizada em algumas situações para o diagnóstico da febre aftosa. A inoculação de leitões também tem sido ocasionalmente realizada como teste confirmatório da presença do PRRSV, do vírus da peste suína clássica (CSFV) e da peste

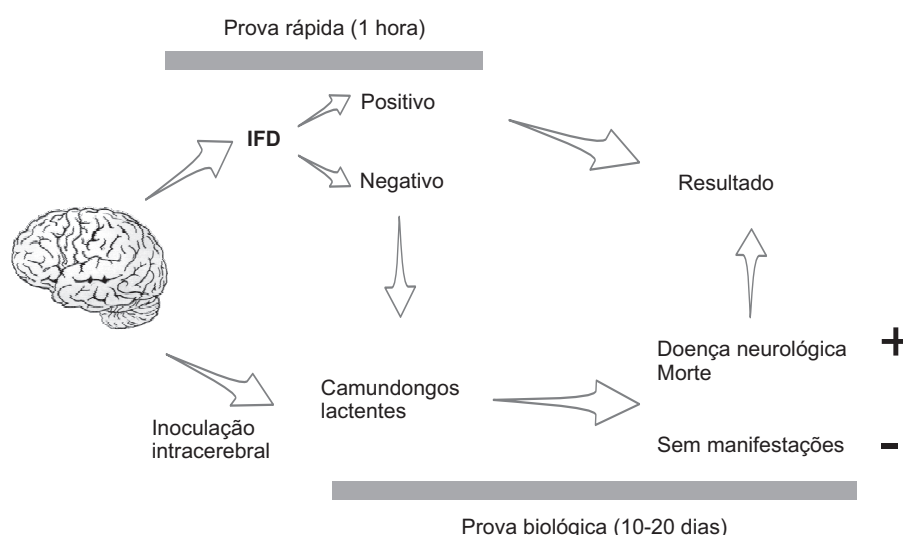


Figura 11.5. Protocolo para o diagnóstico de raiva animal. Impressões do cérebro do animal suspeito são submetidas à imunofluorescência direta (IFD) para a detecção de antígenos virais. Em caso positivo, o diagnóstico é comunicado imediatamente. Após, uma suspensão do cérebro macerado é inoculada pela via intracerebral em camundongos lactentes, que são observados por até 30 dias. Em casos positivos, os animais apresentam sinais neurológicos severos e morrem geralmente entre os dias 8 e 20. A ausência de manifestações clínicas e morte ao final do período indicam que o material é negativo para vírus. A prova biológica deve ser realizada nas amostras que foram positivas na IFD e, principalmente, nas amostras que foram negativas.

suína africana (ASFV). Esse método já foi utilizado para a detecção de vários vírus, incluindo o BTV, vírus da estomatite vesicular (VSV), poxvírus ovino, entre outros. No entanto, este sistema tem sido gradualmente substituído por métodos que não utilizam animais e que produzem resultados equivalentes ou superiores.

4.1.3 Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação

Alguns vírus possuem a capacidade de se ligar a moléculas da membrana plasmática de eritrócitos de determinadas espécies animais e provocar a sua aglutinação. Essa atividade, denominada hemaglutinação (HA), pode ser utilizada como indicador da presença desses vírus em amostras clínicas. A hemaglutinação é o resultado da ligação de glicoproteínas da superfície dos vírions, denominadas genericamente *hemaglutininas*, com receptores da superfície dos eritrócitos. Os vírus que possuem essa atividade são chamados de hemaglutinantes. A técnica de HA tem sido muito utilizada para pesquisar e quantificar vírus em diversos materiais, porém é aplicável somente aos vírus que apresentam essa propriedade biológica. Essa propriedade também é utilizada para a pesquisa de anticorpos capazes de inibir a hemaglutinação, na técnica sorológica denominada inibição da hemaglutinação (HI).

Ao contrário da reação de HA, que somente revela uma atividade biológica do vírus, a reação de HI é uma prova sorológica e, dessa forma, pode ser empregada tanto para a identificação do agente como para o diagnóstico sorológico de infecções por esses vírus. O princípio da HI baseia-se na capacidade de anticorpos se ligarem nas hemaglutininas virais e inibirem a sua atividade hemaglutinante. A HI realizada com um soro-padrão conhecido frente a um material positivo recém-detectado na HA possibilita a identificação do agente. Por exemplo, a detecção de atividade hemaglutinante em líquidos provenientes de fetos suínos abortados indica a presença de vírus. A inibição dessa atividade hemaglutinante com um soro-padrão para o parvovírus suíno (PPV) indica que o agente presente nos fluidos é o PPV. Por outro lado, a detecção de anticorpos inibido-

res da hemaglutinação contra um determinado vírus no soro de um animal indica que este já foi exposto ao agente.

As técnicas de HA e HI são realizadas em tubos ou em placas de microtitulação, requerem eritrócitos frescos (galinha, cobaias ou coelhos, dependendo do vírus) e permitem a obtenção do resultado em uma a duas horas. Tanto a HA como a HI são técnicas simples, rápidas e de baixo custo, possuindo boa sensibilidade e especificidade. No entanto, são aplicáveis somente aos

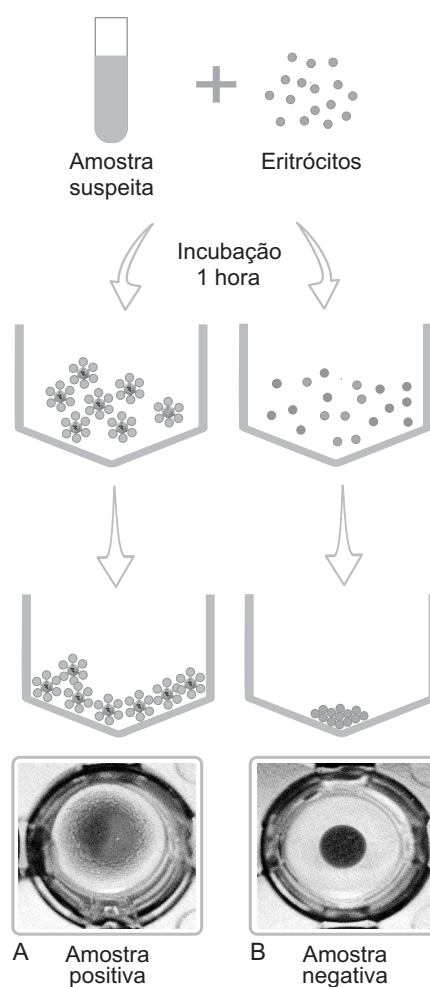


Figura 11.6. Teste de hemaglutinação (HA) para demonstração de vírus hemaglutinantes em amostras clínicas. A amostra suspeita (fluido corporal ou macerado de tecido) é misturada e incubada com uma suspensão de eritrócitos. Na presença do vírus hemaglutinante, os eritrócitos aglutinam-se e se depositam como uma fina camada de contorno irregular no fundo da cavidade. Na ausência do vírus suspeito, os eritrócitos livres rolam para o fundo da cavidade, formando um botão espesso de contorno bem definido.

vírus que possuem atividade hemaglutinante, além de não serem automatizáveis. A HI pode ser relativamente trabalhosa se houver a necessidade de pré-tratamento do soro para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação. A dificuldade de se obter eritrócitos da espécie indicada também pode representar uma restrição ao uso dessas técnicas na rotina diagnóstica. A HA e a HI são utilizadas para os vírus da influenza e parainfluenza, para alguns poxvírus e togavírus, picornavírus, parvovírus, reovírus e adenovírus. Os principais vírus que possuem atividade hemaglutinante e as espécies dos eritrócitos que são aglutinados por esses vírus estão apresentados na Tabela 3.1 (Capítulo 3). A Figura 11.6 apresenta uma ilustração da técnica de HA.

4.1.4 Detecção de antígenos

A multiplicação dos vírus nos tecidos do hospedeiro resulta na produção de grande quantidade de proteínas virais. Uma parte dessas proteínas – as chamadas proteínas estruturais – é incorporada nas partículas víricas produzidas, mas grande parte delas e também as proteínas não-estruturais permanecem nas células infectadas. Como consequência, os tecidos infectados geralmente possuem uma quantidade considerável de antígenos virais. Os fluidos corporais (sangue, secreções, excreções) também podem conter células infectadas e/ou proteínas virais solúveis. A detecção desses antígenos pelo uso de anticorpos específicos é um dos métodos mais utilizados no diagnóstico de infecções víricas. A disponibilidade de anticorpos para virtualmente todos os vírus de interesse veterinário possibilita a aplicação universal desse método. Além do uso em diagnóstico, as técnicas de detecção de antígeno possuem uma ampla aplicabilidade em diversas áreas da Virologia.

A complementaridade química entre os anticorpos e determinantes antigênicos e exclusivos de cada espécie de vírus confere a especificidade do método. Várias técnicas que utilizam este princípio foram desenvolvidas e são utilizadas na rotina de laboratórios de virologia. Em geral, são técnicas simples, rápidas, de custo baixo e

com boa sensibilidade e especificidade. A maior restrição refere-se à dificuldade de automação, o que torna trabalhosa a sua realização em um número grande de amostras. Não obstante, algumas etapas dessas técnicas podem ser automatizadas, o que reduz a dificuldade para se testar várias amostras simultaneamente.

As técnicas mais utilizadas para a detecção de antígenos virais são a IFA, a IPX, os ELISAs e imunocromatográficos, além dos *imunoblots* (*Western blot*, *dot* e *slot blot*). O princípio de cada uma dessas técnicas foi descrito no Capítulo 3. Em resumo, as proteínas virais são detectadas por anticorpos específicos, conjugados com substâncias indicadoras que permitam a sua detecção. Na IFA, os anticorpos são conjugados com um marcador fluorescente (fluoresceína), que pode ser visualizado sob UV. No caso da IPX e ELISAs, os anticorpos são marcados com uma enzima, que reage com o substrato e promove a mudança de cor deste ou emite luminosidade. A luminosidade emitida pode ser detectada por aparelhos (luminômetros) ou captada em filmes de raios X. Proteínas virais presentes em uma variedade de amostras podem ser detectadas por esses métodos. O desenvolvimento de *kits* diagnósticos para a utilização em consultórios, clínicas ou mesmo a campo popularizou e ampliou o uso dessas técnicas.

Exemplos de aplicação dessas técnicas na rotina diagnóstica incluem a detecção de antígenos virais em impressões de cérebro (raiva, BoHV-5, cinomose); em células descamativas em secreções nasais (BoHV-1, BoHV-5, BRSV, BVDV, vírus da cinomose [CDV]), em esfregaços sangüíneos (BVDV); conjuntivais (CDV) e genitais (PRRSV, BoHV-1). Esses testes são realizados em secções ou impressões de tecidos, em células imobilizadas em placas de cultivo ou em lâminas histológicas. A detecção de antígenos virais em cortes histológicos possui uma grande aplicação para estudos retrospectivos, pois as proteínas previamente fixadas e incluídas em parafina preservam a sua estrutura antigênica por longos períodos. Nesses casos, utiliza-se a técnica de IPX, associada com protocolos para a recuperação/renaturação dos antígenos e com sistemas de amplificação do sinal emitido (sistema avidina-biotina).

Outra importante aplicação desse método é a detecção e identificação de antígenos após a multiplicação do vírus em cultivos celulares. A confirmação da identidade do agente é importante para os vírus que produzem citopatologia pouco característica e, principalmente, para aqueles que não produzem ECP. Nesses casos, a detecção das proteínas virais nos cultivos se constitui no indicador da presença do agente no material suspeito.

Para a pesquisa de antígenos em fluidos (sangue, sêmen, secreções nasais), podem ser utilizadas técnicas imunoenzimáticas (ELISA), imunocromatográficas e *imunoblot*. As técnicas imunoenzimáticas do tipo ELISA possuem diversas variações (detecção de antígenos e anticorpos – ver Capítulo 3), são geralmente muito sensíveis, específicas e automatizáveis, permitindo o teste simultâneo de um número grande de amostras. Possuem especial aplicação para o diagnóstico em rebanhos. Um exemplo desse uso é a triagem de rebanhos à busca de animais persistentemente infectados pelo BVDV. Existem *kits* comerciais para a detecção de antígenos do BVDV no soro sanguíneo, no leite ou em biópsias de pele. Os fragmentos de pele, geralmente coletados da orelha, podem ser submetidos à IPX ou a ensaios imunoenzimáticos em placas, o

que facilita o diagnóstico pelo teste simultâneo de um número grande de amostras. Essa técnica tem apresentado grande aplicação em programas de controle e erradicação dessa enfermidade na Europa e América do Norte. Também tem sido utilizada para identificar rebanhos positivos, através do teste de amostras de leite coletadas na indústria. Antígenos do BLV e de outros retrovírus (CAEV, EIAV) também podem ser detectados no sangue por técnicas imunoenzimáticas ou por *imunoblots*. A Figura 11.7 lista os métodos diretos de detecção de antígenos virais em amostras clínicas.

O princípio dos métodos cromatográficos e imunoenzimáticos foi utilizado para o desenvolvimento de testes aplicáveis em clínicas e consultórios. Vários testes para a detecção de antígenos e também de anticorpos, sob a forma de *kits*, estão disponíveis comercialmente. São testes rápidos (15-30 min), de execução simples e geralmente possuem boa sensibilidade e especificidade. Dentre os testes disponíveis em *kits* para a detecção de antígenos se incluem aqueles para a detecção dos parvovírus canino (CPV) e felino (FLPV) em fezes; rotavírus tipo A em fezes de bovinos, suínos e caninos; vírus da raiva na saliva ou no encéfalo de cães, bovinos e de furões; vírus da leucemia

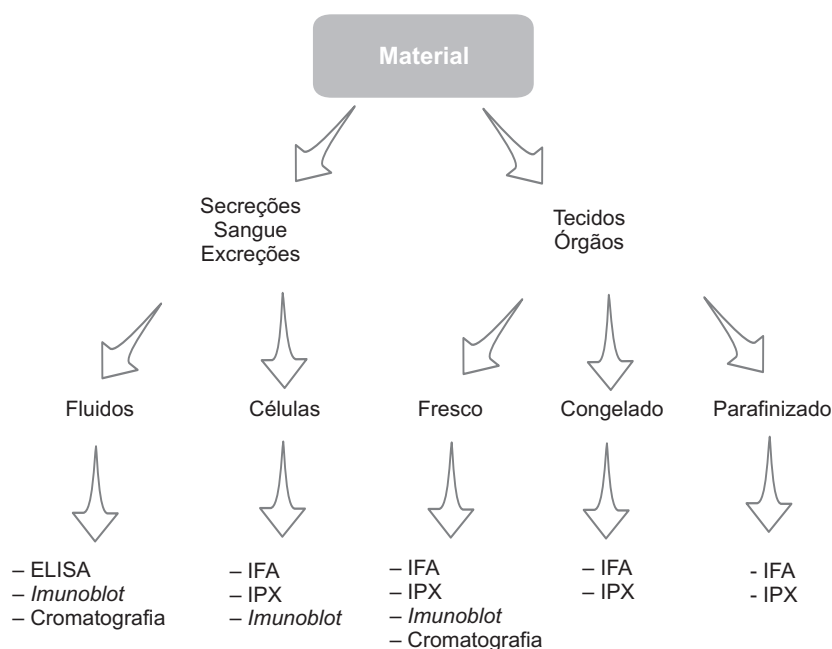


Figura 11.7. Técnicas de detecção de antígenos virais em amostras clínicas.

felina (FeLV) no sangue, plasma ou soro; vírus da gastroenterite transmissível (TGEV) em fezes de suínos; vírus da influenza aviária em fezes de aves; coronavírus em fezes de bovinos e caninos; CDV em secreções nasais, conjuntivais ou urina de cães, entre outros. A grande vantagem desses testes é a realização *in loco*, como suporte à investigação clínica, ou seja, paralelamente ao exame clínico, o veterinário pode recorrer ao exame laboratorial para dar suporte ao seu diagnóstico. O custo individual dos testes é relativamente alto, o que restringe o seu uso em nível populacional.

A técnica de radioimunoensaio (RIA) já teve importante aplicação na detecção e diagnóstico de vírus, mas, atualmente, encontra-se em desuso, pela disponibilidade de outras técnicas equivalentes e que não requerem o uso de marcadores radioativos. Assim, possui aplicação restrita e específica em algumas situações. A aglutinação em látex, técnica de execução simples que se popularizou no diagnóstico de gestação em mulheres, tem sido difundida em *kits* para uso no diagnóstico de viroses de pequenos animais. No entanto, a sua rapidez e simplicidade são contrabalançadas por problemas de sensibilidade e especificidade.

Em geral, protocolos que resultem em aumento de sensibilidade, especificidade e permitam maior facilidade de execução têm sido continuamente desenvolvidos. Com isso, técnicas modificadas e aperfeiçoadas – a maioria delas baseada em princípios já bem estabelecidos – têm sido continuamente incorporadas aos métodos tradicionais de detecção de antígenos.

4.1.5 Detecção de ácidos nucleicos

A multiplicação dos vírus nos tecidos do hospedeiro resulta na produção de grande quantidade de ácidos nucleicos virais, incluindo RNA mensageiro (mRNA), RNAs intermediários (vírus RNA), além do RNA e DNA genômicos. Portanto, os tecidos infectados e fluidos corporais e excreções freqüentemente contêm quantidades consideráveis de ácidos nucleicos de origem viral. A detecção desses ácidos nucleicos, com base na especificidade das seqüências e na complementaridade de bases, constitui-se no fundamento das técnicas moleculares de diagnóstico.

Essas técnicas foram desenvolvidas a partir da década de 1980 e tiveram um impacto notável na pesquisa e no diagnóstico de inúmeras doenças humanas e animais. A sua versatilidade e a aplicabilidade praticamente universal resultaram em rápida difusão e adoção como técnicas preferenciais de diagnóstico em inúmeros laboratórios. O princípio das técnicas de hibridização (*Southern e Northern blot, dot/slot blot*) foi utilizado e ampliado para o desenvolvimento da técnica de PCR, uma técnica altamente específica que é capaz de detectar quantidades mínimas do genoma viral em amostras clínicas. A universalidade de aplicações do PCR foi ampliada e adaptada para detecção rápida e possibilidade de quantificação do ácido nucleico presente na amostra (PCR em tempo real). Por outro lado, as técnicas de hibridização *in situ* (ISH) e PCR *in situ*, que se constituem em variações das técnicas originais, possuem aplicação restrita em diagnóstico, sendo mais utilizadas em pesquisa e em estudos de patogenia.

Quando a amostra clínica contém uma determinada quantidade do ácido nucleico viral, pode-se detectá-lo pelas técnicas de hibridização, utilizando-se sondas moleculares marcadas com isótopos radioativos ou com enzimas. Quando a quantidade de ácidos nucleicos é muito pequena para ser detectada diretamente, a técnica de PCR pode ser utilizada para multiplicar/amplificar o número de moléculas presentes na amostra.

As técnicas de detecção de ácidos nucleicos podem ser utilizadas para detectar DNA e RNA e são aplicáveis a qualquer vírus, desde que se conheçam algumas seqüências do seu genoma. Atualmente, as seqüências genômicas parciais ou totais de virtualmente todos os vírus de interesse veterinário encontram-se disponíveis em bancos genômicos acessíveis via Internet. Da mesma forma, existe uma variedade de *softwares* destinados ao desenho de *primers* e sondas utilizando essas seqüências.

As técnicas moleculares podem ser utilizadas para detectar ácidos nucleicos virais em material clínico de qualquer natureza, incluindo tecidos, sangue (soro/plasma), células sangüíneas, secreções (leite, saliva, secreções nasais, urina, sêmen), descamações cutâneas, entre outros. Podem também ser utilizadas para detectar o geno-

ma viral em cultivos celulares previamente inoculados com o material suspeito. Essas técnicas possuem especial utilidade para detectar quantidades muito pequenas do material genético; para vírus que não multiplicam com eficiência em cultivo celular e também para detectar o agente já inativado em amostras inadequadamente conservadas. Também possuem aplicação especial para a detecção de infecções latentes, nas quais o genoma do vírus permanece inativo nas células do hospedeiro.

A seguir será dado enfoque para a utilização das técnicas de detecção de ácidos nucleicos com fins diagnósticos.

4.1.5.1 Hibridização (*Southern/Northern blot*)

Para a detecção por hibridização, os ácidos nucleicos devem ser inicialmente extraídos da amostra clínica e, posteriormente, imobilizados em membranas. A detecção é realizada por sondas moleculares específicas – que são seqüências de nucleotídeos complementares às do ácido nucleico do agente pesquisado. A especificidade da reação deve-se à especificidade e complementaridade do pareamento de bases. Para permitir a detecção, as sondas são conjugadas com isótopos radioativos ou com enzimas. Esses marcadores são, então, detectados pela captação da radiação emitida (marcação radioativa) ou pela observação da ação enzimática em substratos. Dentre as vantagens dessas técnicas, destacam-se a boa sensibilidade, especificidade e relativa rapidez na obtenção dos resultados. São aplicáveis a qualquer agente infeccioso desde que se conheça parte da seqüência do genoma; e podem ser executadas em vários tipos de material clínico. As suas restrições referem-se principalmente à necessidade de equipamentos e tecnologia, além de serem técnicas relativamente recentes e, por isso, ainda não assimiladas por muitos laboratórios.

A técnica de hibridização para a detecção de DNA, após a sua separação por eletroforese, denomina-se *Southern blot*. É aplicável para a detecção de vírus com genoma DNA. A detecção de RNA por um método equivalente é denominada *Northern blot*. É aplicável a qualquer vírus, pois

tanto os vírus RNA como os vírus DNA necessitam da produção de RNAs durante a sua replicação. O *dot/slot blot* são versões simplificadas dessas técnicas, nas quais o ácido nucleico é detectado diretamente na membrana, sem a separação prévia por eletroforese.

4.1.5.2 Reação da polimerase em cadeia

A PCR é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos que, quando utilizada com fins diagnósticos, permite a detecção e identificação de quantidades mínimas do material genético do agente suspeito. Pode ser aplicada em qualquer material clínico que, potencialmente, contenha o agente ou o seu ácido nucleico. Possui aplicabilidade universal, ou seja, pode ser realizada para qualquer vírus, desde que se disponha de suas seqüências nucleotídicas. As principais vantagens da técnica são: a) sensibilidade (pode detectar mínimas quantidades do agente); b) especificidade (altamente específica para o agente); c) rapidez (pode ser realizada em poucas horas); d) universalidade (pode ser aplicada para qualquer vírus); e) pode ser realizada em quantidades mínimas da amostra; f) é capaz de detectar também vírus que já esteja inviável; g) pode ser adaptada para detectar vários subtipos do mesmo vírus ou vírus diferentes em uma mesma reação (PCR multiplex); h) pode ser padronizada para aumentar a sensibilidade e especificidade (*nested PCR*); i) pode ser utilizada para detectar ácidos nucleicos em tecidos incluídos em parafina (útil em estudos retrospectivos) ou j) pode ser realizada em amostras conservadas de forma imprópria para a realização de outras técnicas.

O custo dos testes tem se reduzido ao longo do tempo e já não representa uma restrição importante para o diagnóstico. Dentre as restrições se incluem o risco de contaminação e a produção de resultados falso-positivos; a necessidade de se utilizar substâncias tóxicas para extrair os ácidos nucleicos, necessidade do aparelho termociclador (pode ser limitante para laboratórios pequenos) e dificuldades na padronização.

Pela suas vantagens, essa técnica tem sido padronizada e utilizada para o diagnóstico de

inúmeras viroses. Possui especial aplicação para a detecção de quantidades pequenas de ácido nucléico, quando outras técnicas são incapazes de fazê-lo. É muito útil para a detecção de bovinos portadores do BoHV-1 e BoHV-5 e de suínos portadores do PRV em programas de erradicação; e também para a detecção de vários vírus no sêmen ou em secreções. Pode ser aplicada em fases precoces da infecção, para detectar vírus difíceis de se isolar e quando ainda não há indicadores sorológicos. Ou seja, a PCR encontra aplicação em todas as situações em que exista a necessidade de se detectar especificamente um agente viral em material suspeito. Também possui um amplo espectro de aplicação em várias áreas da Biologia e Medicina, constituindo-se em uma das técnicas mais úteis e de maior impacto nas Ciências Biológicas.

4.1.5.3 PCR em tempo real

A técnica tradicional de PCR envolve as etapas de extração do ácido nucléico, amplificação e detecção do produto amplificado. O procedimento integral pode demandar várias horas até a obtenção do resultado. Da mesma forma, a quantidade de ácido nucléico presente na amostra original é de difícil quantificação. Nos últimos anos, foi desenvolvida a técnica de PCR em tempo real, na qual as etapas de amplificação podem ser monitoradas à medida que vão ocorrendo, pela utilização de sondas marcadas com substâncias indicadoras que são liberadas a cada ciclo de amplificação. O sinal emitido a cada ciclo é, então, captado e quantificado por um *software* acoplado a um microcomputador. Isso permite o acompanhamento da reação e a visualização do acúmulo dos produtos à medida que são produzidos, isto é, o resultado pode ser obtido bem antes do final da reação, o que reduz significativamente o tempo de realização. Além de abreviar o tempo da reação, não é necessário analisar os produtos por eletroforese em géis de agarose. Essa técnica também permite a quantificação dos ácidos nucléicos presentes na amostra. A técnica de PCR em tempo real tem sido também adaptada para a realização a campo, na qual as amostras são coletadas,

processadas e rapidamente testadas, fornecendo o resultado ainda na propriedade. Termocicladores portáteis, acoplados a microcomputadores, têm sido desenvolvidos com essa finalidade. Essa estratégia pode ser muito útil na investigação de surtos de doenças de importância sanitária estratégica, como a febre aftosa, peste suína clássica, influenza aviária, entre outras. Nesses casos, a investigação clínica e epidemiológica no rebanho pode já ser acompanhada do diagnóstico definitivo, o que agiliza a tomada de decisões e a adoção de medidas para o controle da infecção.

4.1.5.4 Hibridização *in situ*/ PCR *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica de detecção de ácidos nucléicos, a exemplo do *Southern* e *Northern blot*. A diferença fundamental é que a ISH é realizada em cortes histológicos e os ácidos nucléicos são detectados diretamente nos tecidos. Além da boa sensibilidade e especificidade, essa técnica permite a identificação das células infectadas. Em razão disso, a ISH é muito utilizada em estudos de patogenia de infecções víricas. Também permite a detecção de vírus em tecidos conservados por longo tempo em blocos de parafina ou em lâminas histológicas, possibilitando estudos retrospectivos. As suas aplicações diagnósticas, no entanto, são restritas, sobretudo, pela sua complexidade, necessidade de pessoal treinado e tempo requerido para a sua execução. Em geral, as técnicas de imunoistoquímica (IHC) têm substituído a ISH com fins diagnósticos. Em alguns casos, especialmente quando a má conservação dos antígenos virais nos tecidos prejudica o reconhecimento das proteínas virais pelos anticorpos, a ISH pode substituí-la com vantagens.

A técnica de PCR *in situ* também é realizada em cortes de tecidos, e a amplificação dos ácidos nucléicos virais pode ser detectada diretamente nas células infectadas. A exemplo da ISH, essa técnica possui aplicação restrita em diagnóstico, sobretudo, pela sua complexidade e requerimento de equipamento específico. Possui algumas aplicações em estudos de patogenia e biologia de determinadas infecções víricas.

4.2 Métodos indiretos – diagnóstico sorológico

A detecção de anticorpos no soro é muito utilizada com fins diagnósticos em Virologia. As infecções víricas induzem uma resposta imunológica específica, mediada por anticorpos (além de células), que persiste por um tempo variável e que pode ser detectada por diversas técnicas. Os anticorpos produzidos contra um determinado vírus são estritamente específicos para este agente. Por isso, as técnicas de detecção de anticorpos são também específicas, permitindo distinguir a resposta sorológica produzida contra vírus diferentes. Da mesma forma, as técnicas sorológicas podem ser altamente sensíveis, capazes de detectar quantidades mínimas de anticorpos e de identificar quase a totalidade dos animais que os possuem. Variações dessas técnicas permitem não só a detecção, mas também a quantificação dos anticorpos presentes no soro. Os níveis de anticorpos são geralmente expressos como *títulos*, que representam a recíproca da maior diluição do soro, na qual os anticorpos – ou o seu efeito – podem ser detectados. Algumas técnicas são também automatizáveis, permitindo o teste de um número grande de amostras simultaneamente, sendo muito úteis para estudos de rebanhos. As técnicas de detecção de anticorpos são denominadas genericamente *técnicas sorológicas*, e a análise da resposta sorológica a antígenos é denominada genericamente *sorologia*.

Os testes sorológicos possuem aplicações tanto individuais como em rebanhos ou em populações. O seu uso individual, como método auxiliar à investigação clínica, possui repercussão limitada. No entanto, a detecção de anticorpos possui aplicações importantes na identificação de animais portadores de alguns vírus, na detecção de infecção intra-uterina e na identificação da fase aguda de algumas viroses. Por outro lado, o seu uso populacional pode apresentar uma repercussão sanitária mais importante, por permitir o conhecimento sobre a situação da infecção e, ao mesmo tempo, indicar a necessidade e/ou viabilidade de programas de combate. As técnicas sorológicas têm aplicação especialmente relevante em estudos epidemiológicos, em triagens e

monitoramentos de rebanhos. Testes sorológicos também são utilizados para se verificar a condição imunológica de rebanhos e para avaliar o potencial imunogênico e a cobertura conferida por vacinas.

Os resultados dos exames sorológicos realizados em cada situação devem ser interpretados à luz de conhecimentos sobre a biologia e resposta imunológica a cada vírus. Testes sorológicos realizados em uma amostra única podem ter significados diferentes, dependendo do vírus. Para os vírus que produzem infecções agudas autolimitantes – que constituem a maioria –, o resultado positivo em um teste isolado indica apenas exposição prévia ao agente (ou vacinação). Em populações, resultados positivos em uma amostragem única podem indicar a circulação prévia ou atual do agente na população. Em alguns casos, a quantificação dos anticorpos pode indicar se a exposição foi recente ou remota. Para infecções cuja resposta humoral é de curta duração, a detecção de altos títulos de anticorpos indica uma exposição recente ao agente. Para os vírus que estabelecem infecções persistentes (todos os retrovírus) e latentes (herpesvírus), um teste sorológico positivo indica a condição de portador. Em monitoramentos sorológicos da febre aftosa, a detecção de anticorpos reagentes no teste VIA indica que houve infecção, e não vacinação. Ao se interpretar o resultado de um teste sorológico deve-se considerar também a possibilidade dos anticorpos detectados terem sido adquiridos passivamente (via placenta e/ou colostro) ou terem sido induzidos por vacinas.

A sorologia também pode ser utilizada como método auxiliar à clínica, em investigações de eventos de doença isolada ou em grupos de animais. Nesses casos, podem-se adotar duas estratégias: a realização de sorologia pareada ou a detecção de IgM específica para o agente suspeito. A sorologia pareada deve ser realizada com duas amostras coletadas com intervalo de duas a três semanas (uma durante a fase aguda e a outra na fase de convalescença). Um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos entre as coletas – denominado soroconversão – é um indicativo de que a doença foi causada pelo agente sob investigação. A detecção de IgM espe-

cífica para o vírus suspeito em amostras únicas, coletadas durante a fase aguda, também permite o diagnóstico da infecção. Nesse caso, um único teste já é suficiente para o diagnóstico, pois os níveis séricos de IgM só se encontram aumentados durante a infecção aguda. Essa estratégia tem sido utilizada no diagnóstico de várias viroses (hantavirose, infecção pelo vírus Junin, dengue, encefalites eqüinas pelos togavírus – encefalite eqüina venezuelana, VEE, por exemplo – e pelo vírus do Nilo Ocidental [WNV]) e encontra aplicabilidade especial para os vírus que produzem viremia transitória e cujo isolamento é difícil. No caso da VEE, a detecção de IgM por um teste ELISA é o método mais utilizado para o diagnóstico da infecção aguda.

A realização de testes sorológicos em animais recém-nascidos, no soro coletado previamente à ingestão de colostro, é um indicativo de infecção intra-uterina. Testes sorológicos também são úteis para monitorar os níveis de imunidade adquiridos passivamente pela placenta ou pelo colostro.

De acordo com o seu princípio, as técnicas sorológicas podem ser divididas em três grupos: a) técnicas que detectam diretamente a interação entre os anticorpos com os antígenos virais (RIA, ELISA, *immunoblots*, IFA, IPX); b) técnicas em que a interação anticorpo-antígeno resulta em efeitos não relacionados com o vírus (fixação do complemento, aglutinação em látex) e c) técnicas que mensuram diretamente a capacidade dos anticorpos de bloquear ou alterar alguma atividade biológica do vírus (SN, HI). Algumas dessas técnicas também estão amplamente difundidas e popularizadas, estando disponíveis em *kits* para uso em clínicas e consultórios veterinários.

Ao se padronizar uma técnica sorológica para um determinado agente, deve-se considerar e avaliar as seguintes propriedades: sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo. A *sensibilidade* se refere ao percentual de animais que possuem anticorpos e que são detectados pelo teste. Individualmente, a sensibilidade depende da capacidade do teste em detectar quantidades mínimas de anticorpos. A sensibilidade de um teste em padronização ou

implementação pode ser avaliada comparando-se os seus resultados com os resultados de um teste padrão (*gold standard*). A *especificidade* de um teste sorológico é medida pelo percentual de animais negativos (sem anticorpos) que são considerados positivos no teste. Uma técnica sorológica para ser utilizada em diagnóstico deve resultar em um número mínimo de falso-negativos (boa sensibilidade) e mínimo de falso-positivos (boa especificidade). A sensibilidade e especificidade são propriedades intrínsecas de cada teste sorológico e podem variar entre as diferentes técnicas. O valor preditivo positivo mede a probabilidade de resultados positivos no teste serem realmente positivos; o valor preditivo negativo é um indicador da probabilidade de resultados negativos serem realmente negativos.

A Figura 11.8 ilustra a utilização de técnicas sorológicas para o diagnóstico de infecções víricas.

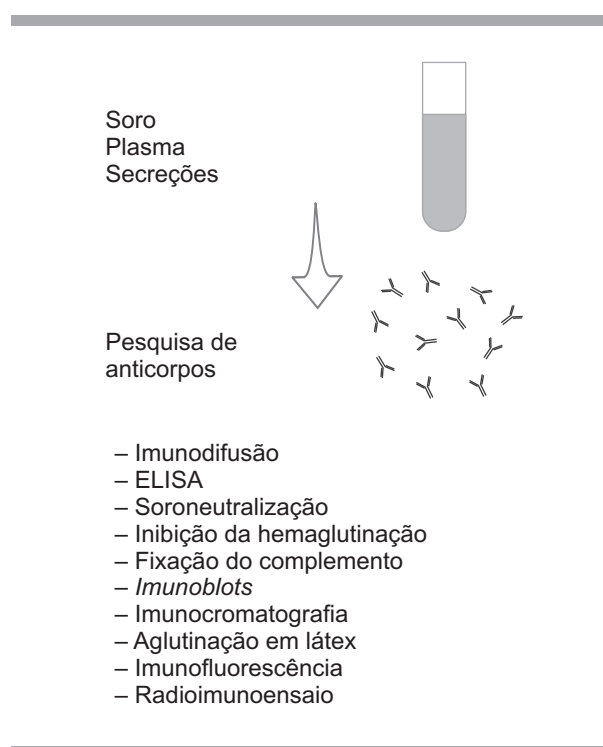


Figura 11.8. Técnicas utilizadas para a pesquisa de anticorpos antivirais no soro ou em secreções.

A seguir, estão descritas as principais técnicas sorológicas, seus princípios e aplicações:

4.2.1 Imunodifusão em ágar

O princípio da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é insolubilização e precipitação de complexos formados pela reação antígeno-anticorpo. Esses complexos podem ser visualizados sob a forma de linhas de precipitação no gel de agarose (Figura 11.9). A IDGA é uma técnica simples, de custo baixo, possui boa sensibilidade e especificidade. Pela sua simplicidade e praticidade, pode ser implementada em qualquer laboratório. Foi inicialmente desenvolvida para a detecção de antígenos, mas a sua maior aplicação atual é como teste sorológico. É particularmente útil para inquéritos sorológicos de grandes populações animais, sobretudo, pela sua praticidade e custo baixo. Essa técnica tem sido utilizada para o diagnóstico sorológico de várias viroses, mas possui aplicação particular para o vírus da EIAV (teste de Coggins), BLV, BTV, doença de Gumboro e bronquite infecciosa aviária. A IDGA se constitui no teste oficial de diagnóstico da infecção pelo EIAV, BLV e BTV em vários países. As suas maiores restrições referem-se a problemas de sensibilidade (pode não detectar níveis baixos de anticorpos), especificidade (reações inespecíficas), repetibilidade e tempo para a obtenção dos resultados (até 72 horas).

4.2.2 Soro-neutralização

O teste de soro-neutralização (SN) é utilizado para se detectar anticorpos que possuem capacidade de neutralizar a infectividade do vírus. O teste é geralmente utilizado com soro sanguíneo, mas pode ocasionalmente utilizar outros fluidos corporais que possuam anticorpos. Nesse teste, examina-se o soro suspeito frente a um vírus-padrão previamente conhecido e quantificado. O teste é realizado em microplacas de 96 cavidades, nas quais se incubam diluições crescentes do soro-teste com uma quantidade constante do vírus (geralmente 100-200 DICC₅₀ por cavidade) por um determinado tempo. Após esse período, durante o qual os anticorpos presentes no soro se ligam e neutralizam o vírus, são adicionadas as células de cultivo. As placas, contendo a mistura soro-vírus-células, são incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 48 a 96 h. A presença de anticorpos neutralizantes na diluição testada previne a produção de ECP pelo vírus nos cultivos (Figura 11.10). O aparecimento de ECP indica a ausência de anticorpos neutralizantes suficientes para neutralizar o vírus, na respectiva diluição. Os cultivos podem ser corados com cristal violeta para facilitar a leitura dos resultados. Os

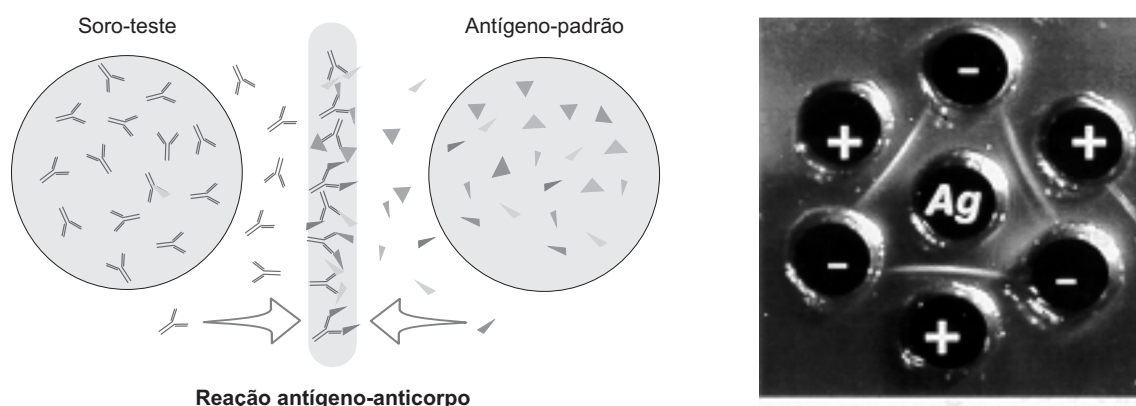


Figura 11.9. Técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). O antígeno padrão é depositado no orifício central e as amostras-teste são colocadas nos orifícios periféricos da roseta perfurada na camada de ágar. Durante as 48-72 h de incubação, antígeno e anticorpos se difundem radialmente a partir dos respectivos orifícios. O encontro entre antígenos e anticorpos resulta em precipitação e formação de uma linha opaca no local. A formação desta linha indica que a amostra é positiva para anticorpos contra o antígeno específico.

tapetes íntegros (pela presença de anticorpos que preveniram a replicação viral) se coram em azul; a ausência de coloração indica a destruição do tapete celular pela atividade do vírus (ausência de anticorpos). Dependendo do objetivo, o teste de SN pode ser realizado para a obtenção de resultado qualitativo (positivo/negativo) ou quantitativo (título de anticorpos). No teste qualitativo, testa-se apenas uma diluição do soro; no teste quantitativo, testam-se várias diluições.

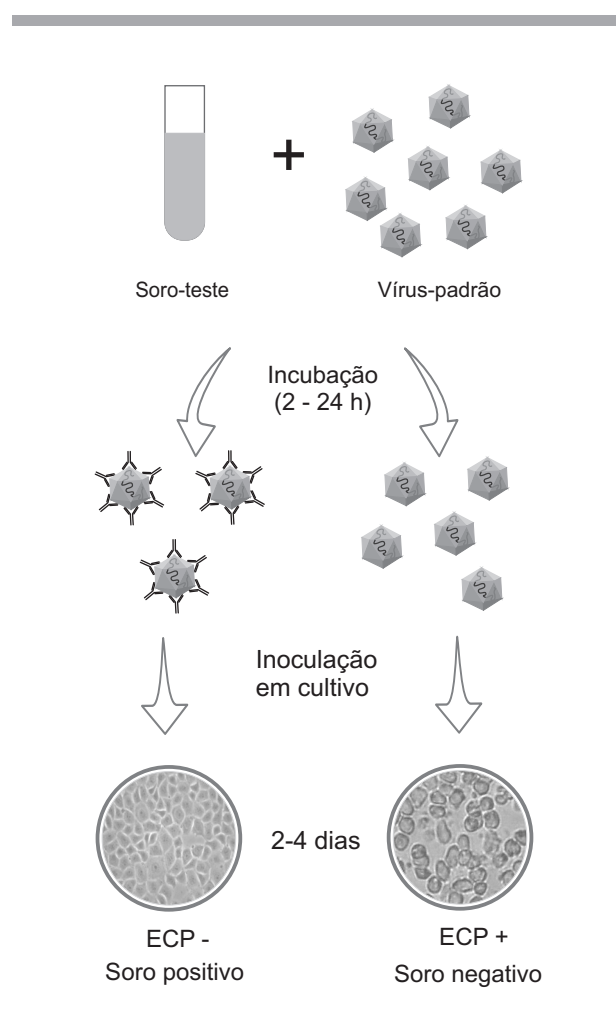


Figura 11.10. Técnica qualitativa de soro-neutralização para a detecção de anticorpos antivirais. Cada soro suspeito – geralmente diluído 1:2 ou 1:10 – é incubado por 2-24 h com uma quantidade constante do vírus em questão. A seguir, são adicionadas células em suspensão a cada cavidade que contém a mistura soro + vírus. As placas são incubadas em estufa de CO₂ por 72-96 h e, então, examinadas sob microscopia ótica para a presença de efeito citopático (ECP). A presença do tapete íntegro indica neutralização viral (amostra positiva para anticorpos). A produção de ECP indica ausência de anticorpos neutralizantes (amostra negativa para anticorpos).

Dentre as técnicas sorológicas, o princípio da SN é o que mais se assemelha às interações entre anticorpos e vírus que ocorrem *in vivo*. A neutralização viral reflete uma atividade dos anticorpos com maior significado biológico. Por isso, a SN é uma das técnicas sorológicas mais utilizadas em Virologia. Como a neutralização de um determinado vírus só ocorre por anticorpos específicos contra ele, essa técnica é altamente específica. A SN também possui boa sensibilidade. As maiores restrições referem-se à necessidade de cultivos celulares (possibilidade de contaminação bacteriana e fúngica, toxicidade do soro), tempo para obtenção dos resultados (até uma semana) e a dificuldade de automação. A SN possui aplicação potencial para qualquer vírus que replique bem em cultivo celular, mas possui aplicação preferencial para determinados vírus, tais como: o BoHV-1, BVDV, bPI-3, BRSV, vários adenovírus, CDV, coronavírus canino (CCoV), PRV, adenovírus canino (CAV), calicivírus felino, herpesvírus eqüinos (EHV), entre outros.

4.2.3 Inibição da hemaglutinação

A detecção de anticorpos capazes de inibir a atividade hemaglutinante de alguns vírus tem sido muito utilizada no diagnóstico virológico. A técnica de detecção é denominada HI e foi descrita na seção 4.1.3. Resumidamente, o soro-teste (puro ou em diluições crescentes) é incubado com uma quantidade predeterminada do vírus padrão em questão (4 ou 8 unidades hemaglutinantes) por uma hora, seguido da adição de uma suspensão de eritrócitos de uma determinada espécie animal, e outra incubação de 1-2 horas. Ao final procede-se a leitura: a presença de anticorpos contra o vírus padrão impede a sua atividade hemaglutinante, e os eritrócitos rolam formando um botão circular de borda bem definida no fundo da cavidade da placa. A ausência de anticorpos resulta na atividade hemaglutinante do vírus, provocando a aglutinação dos eritrócitos e a sua precipitação, formando uma camada difusa, recobrindo todo o fundo da cavidade da placa. A incubação de diferentes diluições do soro permite a quantificação dos anticorpos inibidores da hemaglutinação. A maior diluição do soro capaz

de prevenir a hemaglutinação é denominada título inibidor da HA. A técnica de HI está representada esquematicamente na Figura 11.11.

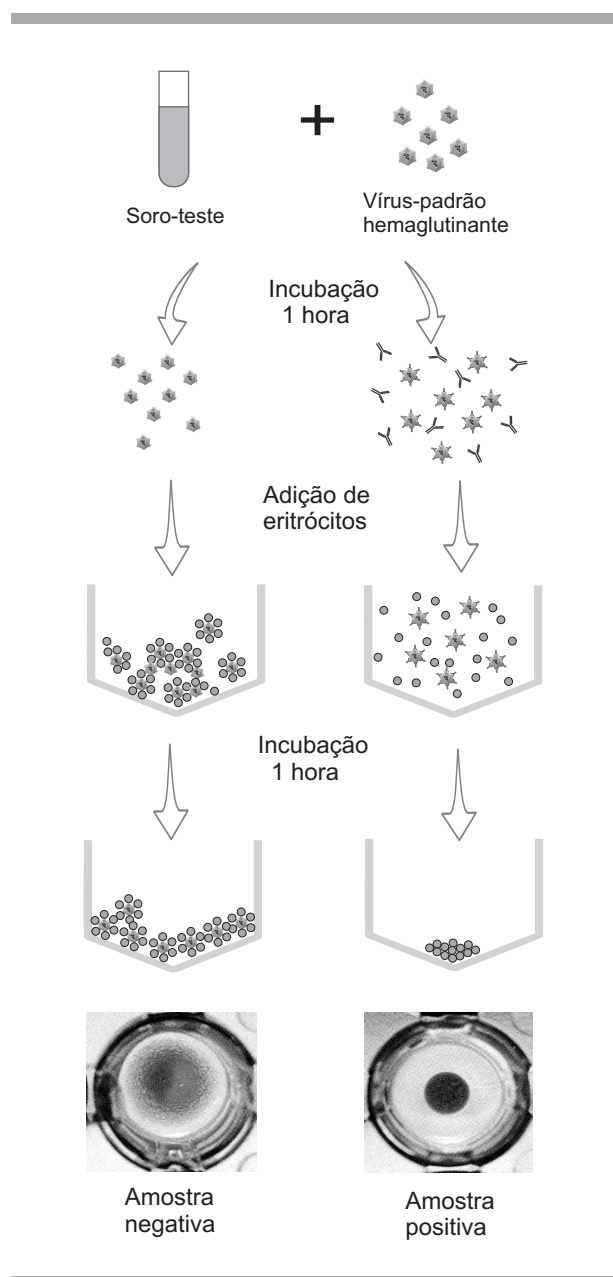


Figura 11.11. Teste de inibição da hemaglutinação (HI). O soro suspeito é incubado com o vírus padrão, que possui atividade hemaglutinante. Após 1-2h, é adicionada uma suspensão de eritrócitos, seguida de outra incubação. A ocorrência de hemaglutinação (camada difusa de eritrócitos no fundo da cavidade) indica a ausência de anticorpos inibidores da hemaglutinação no soro-teste. A formação de um botão de eritrócitos no fundo do poço indica a inibição da atividade hemaglutinante do vírus por anticorpos presentes no soro.

4.2.4 ELISA

Os testes do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são realizados em microplacas de poliestireno de 96 cavidades e utilizam anticorpos marcados com enzimas (peroxidase ou fosfatase alcalina). Embora tenham sido originalmente planejados para a detecção de antígenos (pela ligação específica de anticorpos marcados), a sua maior utilização atual tem sido para a detecção de anticorpos. Desde a sua descrição inicial, em 1971, essa técnica tem tido uma aplicação notável nas diversas áreas da pesquisa e diagnóstico em Biologia. A sua adaptação para uso como teste sorológico literalmente revolucionou o campo do diagnóstico e controle de infecções humanas e animais. A técnica possui muitas variações, cujas aplicações são indicadas para casos específicos. Como técnica sorológica, tem sido utilizada para a detecção de anticorpos contra praticamente todos os vírus de interesse veterinário, por isso a sua enumeração se faz desnecessária. No entanto, a sua aplicabilidade e utilidade não são as mesmas para todos os vírus, principalmente por questões relacionadas à pureza do antígeno e ocorrência de reações inespecíficas, entre outras. Pode ser utilizada individualmente ou em rebanhos, constituindo-se em uma técnica de grande aplicação em estudos epidemiológicos e programas de combate a viroses em grandes populações. Também tem sido usada para a detecção de anticorpos no leite, como forma de identificar rebanhos positivos para determinados vírus. As principais vantagens da técnica incluem a especificidade, sensibilidade, rapidez (resultados em 2-3 horas), custo relativamente baixo, praticidade e capacidade de automação (em uma placa podem ser testadas 96 amostras). Geralmente produz resultados qualitativos (positivo/negativo), mas pode ser adaptada para uma avaliação semiquantitativa dos anticorpos. A técnica pode ser adaptada também para a detecção de isotipos específicos de imunoglobulinas (IgG, M, E), sendo particularmente útil no diagnóstico de algumas infecções víricas agudas (p. ex: dengue, hantavirose, infecção pelo vírus Junin, WNV, encefalites eqüinas), nos quais os níveis de IgM estão au-

mentados na fase aguda. Possui aplicação especial quando utilizada em conjunto com vacinas com marcadores antigênicos, em programas de controle de doenças de importância sanitária estratégica como a doença de Aujeszky. Nesse caso, o vírus vacinal contém deleção em um dos genes que codifica as glicoproteínas do envelope. Animais vacinados com essa vacina podem ser diferenciados dos animais infectados pelo vírus de campo pelo uso de um teste ELISA que detecta anticorpos contra a proteína deletada. Esse sistema tem sido utilizado nos programas de controle e erradicação da doença de Aujeszky na Europa,

Estados Unidos e Japão. Também tem sido utilizado na erradicação dessa doença de granjas de suínos no estado de Santa Catarina.

As maiores restrições ao uso tecnologia de ELISA para o diagnóstico se referem à necessidade dos aparelhos para a lavagem das placas e para a leitura da reação (espectrofotômetro). Para laboratórios com grande rotina diagnóstica, no entanto, esses custos se diluem pelo teste de grande número de amostras. Uma ilustração esquemática da técnica de ELISA está apresentada na Figura 11.12.

4.2.5 Imunofluorescência/ imunoperoxidase

Embora seja mais utilizada para a detecção de antígenos, a IFA também tem sido utilizada com sucesso para a detecção de anticorpos contra vários vírus. O antígeno (proteínas purificadas ou células infectadas) é, inicialmente, imobilizado sobre um suporte sólido (placa de poliestireno ou lâminas de microscopia). O soro-teste é incubado por um determinado período (geralmente 30 min a 1 h), seguido da lavagem para a remoção dos anticorpos não-ligados e pela adição do anticorpo secundário marcado com fluoresceína (FITC). O anticorpo secundário deve ser específico para a espécie animal do soro-teste. A leitura do teste é realizada sob microscopia de UV, na qual se observa a emissão de luz fluorescente quando há a presença de anticorpos específicos contra o antígeno imobilizado. É uma técnica rápida e de fácil execução, porém frequentemente resulta em resultados de difícil interpretação, pela ocorrência de reações inespecíficas. Já foi utilizada para a detecção de anticorpos contra vários vírus, porém, atualmente, tem a sua utilização restrita, principalmente pelo desenvolvimento de técnicas mais específicas e objetivas e que não resultam em reações inespecíficas. No entanto, ainda possui aplicação no diagnóstico sorológico de alguns vírus, como o circovírus suíno, o PRRSV e o ASFV. A técnica de IPX também pode ser adaptada com essa finalidade. Nesse caso, os anticorpos antiespécie são conjugados com as enzimas peroxidase ou fosfatase alcalina.

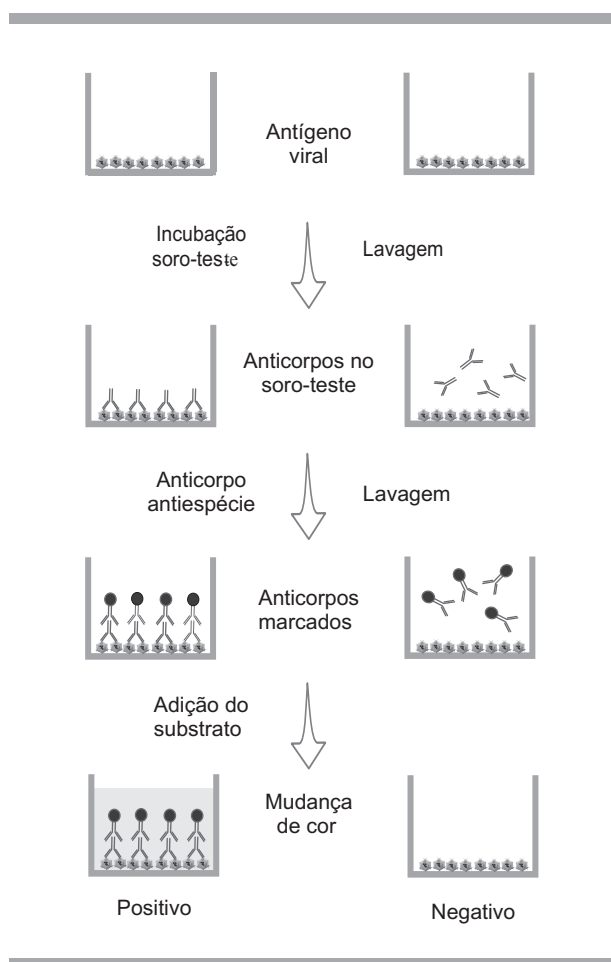


Figura 11.12. Teste imunoenzimático do tipo ELISA para a detecção de anticorpos. As cavidades das placas estão recobertas com o antígeno viral. O soro suspeito é adicionado e incubado por um determinado tempo (1-2 h), seguido de lavagem para a remoção dos anticorpos não-ligados. Adiciona-se um anticorpo antiespécie do primeiro anticorpo, conjugado com a enzima peroxidase. Incuba-se e procede-se uma nova lavagem. A seguir, adiciona-se o substrato. A mudança de cor no substrato indica a presença de anticorpos no soro suspeito.

4.2.6 Imunoblots

As técnicas de *imunoblot* (*Western, dot/slot blots*) podem ser utilizadas para a detecção de anticorpos. Para tal, os antígenos do vírus suspeito devem ser solubilizados e imobilizados em membranas de nitrocelulose ou nylon. Essa imobilização pode ser realizada diretamente pela deposição do material em pontos na membrana ou ser precedida pela separação das proteínas por eletroforese e posterior transferência para a membrana. A membrana é, então, incubada com o soro-teste, seguida de lavagem e incubação com um anticorpo espécie-específico marcado com uma enzima (geralmente a peroxidase). A presença do anticorpo específico no soro é revelada pela ação da enzima no substrato, que resulta em mudança de cor (substratos cromógenos) ou em emissão de luminosidade (substrato luminescente). Essa técnica possui aplicações específicas, como o monitoramento da evolução dos níveis de anticorpos no curso da infecção, mas possui limitada aplicação no diagnóstico sorológico de rotina.

4.2.7 Fixação do complemento

A observação de que os anticorpos ao se ligarem ao antígeno específico são capazes de interagir com componentes do sistema do complemento da espécie homóloga e desencadear a cascata de ativação, levou ao desenvolvimento da técnica de fixação do complemento (FC). O efeito dos componentes ativados do complemento (p. ex: lise de eritrócitos) pode ser observado e é um indicador da presença de anticorpos na amostra-teste. Na ausência de anticorpos contra o agente, não há ativação do complemento pela ausência da formação de complexos antígeno-anticorpo. Nesse caso, não ocorre a lise dos eritrócitos. Essa técnica teve grande aplicação no diagnóstico de infecções víricas e bacterianas. Atualmente, porém, possui aplicação bastante restrita e é utilizada apenas em situações especiais. As maiores restrições à técnica referem-se ao tempo para obtenção dos resultados (24 h) e ao fato de ser uma técnica muito trabalhosa e não-automatizável.

4.2.8 Outras técnicas sorológicas

Vários testes sorológicos, baseados em cromatografia e imunoensaio, também se encontram disponíveis em *kits*, para a realização a campo (consultórios, clínicas). Dentre eles incluem-se o teste para a detecção de IgG contra o CDV; anticorpos totais contra o vírus da peritonite infecciosa felina; anticorpos grupo-específicos contra o vírus da imunodeficiência felina. Esses testes podem ser realizados com sangue total, plasma ou soro e permitem a obtenção do resultado em minutos. Possuem, em geral, boa sensibilidade e especificidade. A sua grande vantagem é a possibilidade de uso em clínicas, paralelamente à investigação clínica. O custo de cada exame, no entanto, é relativamente alto, o que restringe o seu uso populacional.

As técnicas de radioimunoensaio e aglutinação em látex, desenvolvidas inicialmente para a detecção de antígenos, foram posteriormente adaptadas para a detecção de anticorpos e utilizadas em diagnóstico sorológico. A técnica de RIA foi sendo gradualmente substituída com vantagem pelas técnicas imunoenzimáticas e atualmente encontra-se em desuso. A aglutinação em látex tem sido popularizada em *kits*, principalmente para o diagnóstico de viroses de pequenos animais. Esse método tem sido utilizado em clínicas e consultórios, tanto para a detecção de antígenos como de anticorpos. As suas principais vantagens são a simplicidade e a rapidez de execução. Em geral, possuem sensibilidade e especificidade compatíveis com a sua finalidade.

5 Coleta e remessa de material

A qualidade do material que ingressa no laboratório é crítica para o sucesso do diagnóstico. Por isso, as etapas de coleta, acondicionamento, conservação e remessa são tão importantes quanto a realização e interpretação dos testes laboratoriais. E, assim, o papel dos profissionais de campo e dos técnicos de laboratórios envolvidos no diagnóstico se equivale em importância.

A eleição do material adequado para a coleta depende de conhecimentos sobre a biologia e

patogenia do agente. Uma vez eleito, o material deve ser adequadamente coletado, acondicionado e remetido ao laboratório. O material destinado à pesquisa de vírus viável deve ser enviado com a maior brevidade possível. Na impossibilidade de fazê-lo em um curto espaço de tempo, este material deve ser armazenado sob condições adequadas para preservar a viabilidade do agente.

Descrições detalhadas dos aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos observados a campo são muito úteis para a elaboração do diagnóstico e devem fazer parte do histórico que acompanha as amostras ao laboratório.

A seguir, são apresentadas algumas regras básicas para orientar a tarefa de coleta e submissão de amostras clínicas para o diagnóstico virológico. A Figura 11.13 ilustra, de maneira simplificada, a sequência de eventos que acompanham as infecções víricas agudas e que devem ser considerados para se determinar o tipo de material a ser coletado e o momento mais apropriado para fazê-lo.

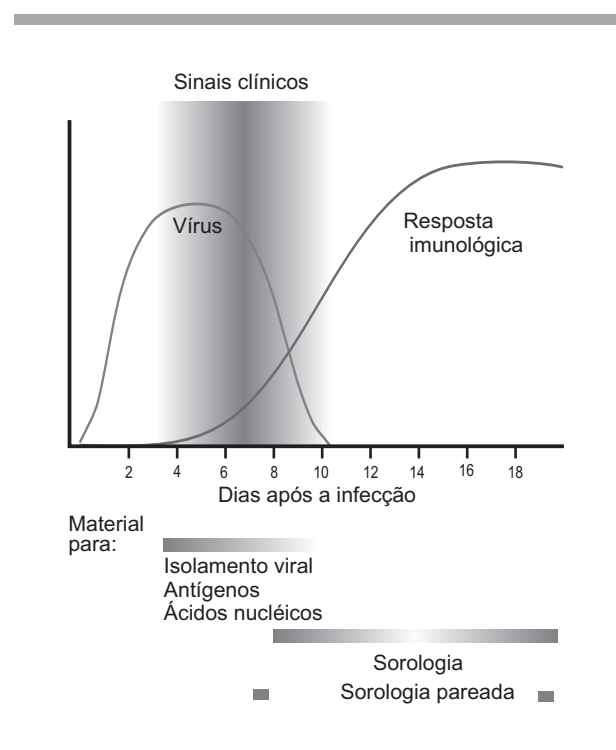


Figura 11.13. Cinética da infecção viral e resposta imunológica, com indicação do momento de coleta de material para diagnóstico.

5.1 Eleição do material a ser coletado

A escolha do material a ser enviado para exame depende de conhecimentos básicos de clínica e de patogenia das enfermidades víricas. Em geral, coleta-se material dos sistemas e órgãos afetados pela patologia, nos quais há maior probabilidade de se detectar o agente ou seus produtos. A coleta de material de animais doentes deve ser realizada tão logo se observe os sinais clínicos, quando os níveis de replicação viral geralmente atingem os valores mais altos. Na necropsia, deve-se dar preferência aos órgãos e tecidos que apresentam alterações macroscópicas. A coleta de sangue para a sorologia é recomendada para uma variedade de infecções. A seguir, são listados os materiais mais indicados para coleta, de acordo com os sistemas afetados:

- enfermidades respiratórias: secreções nasais, aspirados nasofaríngeos, trato respiratório superior, pulmões;
- enfermidades entéricas: fezes, conteúdo intestinal, segmentos intestinais, linfonodos regionais;
- doença genital: secreções genitais, sêmen;
- conjuntivite: raspados conjuntivais, secreções;
- pele: raspados cutâneos, fluidos vesiculares, fragmentos de pele;
- doença neurológica: secreções nasais, cérebro, fluido cérebro-espinhal;
- doença sistêmica: secreções nasais, fezes, soro, sangue integral, linfonodos, baço;
- fetos abortados: placenta, líquidos fetais, timo, baço, pulmão, cérebro;
- outras doenças: soro, órgão ou tecido afetado, secreções/excreções do sistema afetado.

5.2 Cuidados na coleta e acondicionamento

Devem-se observar os seguintes cuidados no momento da coleta de material e no seu acondicionamento:

- secreções nasais, oculares ou genitais devem ser coletadas com o auxílio de suabes. Apesar de existirem suabes para esse uso específico,

muitas vezes não se encontram disponíveis a campo. Nesses casos, pode-se utilizar cotonetes de uso humano, com a ressalva de que não devem conter antissépticos e/ou outras substâncias químicas. Os suabes devem ser coletados agressiva e profundamente na cavidade nasal, para se aumentar a possibilidade de coletar material que contenha o vírus e/ou células descamativas. Após a coleta, os suabes devem ser acondicionados em meio apropriado, solução fisiológica estéril ou PBS e mantidos sob refrigeração (ver abaixo);

- tecidos e fragmentos de órgãos devem ser coletados individual e assepticamente, para minimizar a possibilidade de contaminação bacteriana e fúngica. Para isso, pode-se utilizar lâminas de bisturi, tesouras ou outros tipos de lâmina. Quando o órgão for volumoso (fígado, cérebro), deve-se coletar frações representativas de várias áreas. Os fragmentos de diferentes órgãos devem ser acondicionados em tubos ou em sacos plásticos individuais e bem fechados;

- fetos abortados podem ser enviados inteiros ou submetidos à necropsia para a coleta de tecidos e órgãos;

- fezes devem ser preferencialmente coletadas da ampola retal. Segmentos de intestino devem ser coletados com o seu conteúdo. Para isso, as extremidades da seção intestinal devem ser bem amarradas com barbante;

- sangue integral deve ser coletado com anticoagulante (citrato, heparina ou EDTA). Geralmente, 2 a 3 mL (pequenos animais) e 5 a 10 mL (grandes animais) são suficientes para os propósitos a que se destinam;

- a coleta de sangue para exames sorológicos deve ser realizada de modo a minimizar a hemólise. Tubos estéreis de plástico ou vidro são recomendáveis. Em geral, 1 a 2 mL de soro são suficientes para a maioria dos testes;

- raspados cutâneos ou de mucosas devem ser obtidos pelo uso de lâminas estéreis. Em algumas situações, lâminas de vidro podem ser adequadas para essa finalidade. A raspagem deve ser capaz de coletar as células superficiais da pele e/ou das mucosas;

- as embalagens (tubos e sacos plásticos) em que as amostras serão acondicionadas devem ser

bem fechadas, para evitar o vazamento e mistura do material ou a entrada de água originada do derretimento do gelo;

- as embalagens devem ser rotuladas e identificadas individualmente com caneta ou lápis. Deve-se evitar o uso de rótulos de papel que se desprendam pelo umedecimento e de canetas cuja tinta seja removida pelo contato com a água;

- tubos de vidro ou de outro material frágil devem ser acondicionados de forma a evitar a sua ruptura durante o transporte.

5.3 Conservação e remessa

Os maiores cuidados com a conservação devem ser dispensados aos materiais destinados ao isolamento viral. Essas amostras devem ser prontamente acondicionadas em recipientes estéreis (tubos, sacos plásticos, placas) e conservadas sob temperaturas baixas. A resistência dos vírus sob temperaturas ambientais varia muito: certos vírus são muito resistentes (pox, polio, entero), enquanto outros são muito sensíveis (BRSV, outros paramixovírus). Por isso, o tempo entre a coleta do material e a inoculação deve ser o mais breve possível. Se o intervalo entre a coleta e entrega ao laboratório for curto (até 2 a 3 dias), é preferível manter o material refrigerado (a 4°C). Se o tempo necessário para a remessa e entrega do material for superior a três dias, deve-se optar pelo seu congelamento. O sangue integral destinado ao isolamento viral nunca deve ser congelado. Alguns vírus (p. ex.: BRSV) são extremamente sensíveis a temperaturas ambientais altas, além de não resistirem a congelamentos/descongelamentos sucessivos. Em geral, pode-se adotar a seguinte regra: para horas ou até 2 a 3 dias, conservar o material a 4°C; para mais tempo, congelar a -20°C ou -70°C. Para a remessa, o material deve ser acondicionado em caixas térmicas com gelo reciclável em abundância. Também como regra: quanto menor o tempo decorrido entre a coleta e a inoculação do material, maior será a probabilidade de se isolar o vírus.

Quando o sangue for destinado a exames sorológicos, deve-se proceder à separação do soro (à temperatura ambiente ou a 4-6°C) previamente

ao envio. Após a sua separação, o soro pode ser conservado a 4-6°C por vários meses, sem afetar a viabilidade e atividade biológica das imunoglobulinas. Quando o tempo até o teste for muito prolongado, pode-se optar pelo congelamento do soro. Nunca se deve congelar o sangue antes da separação do coágulo, pois pode inutilizar a amostra para fins diagnósticos.

5.4 Histórico

Todo o material para exame deve ser acompanhado por um histórico detalhado, no qual devem constar informações referentes à amostra, que podem ser necessárias para a elaboração do diagnóstico. Laboratórios de diagnóstico geralmente possuem formulários próprios que especificam as informações requeridas em cada caso. O histórico deve ser anexado na parte exterior do recipiente, para evitar o seu umedecimento e inutilização. Se incluído no interior do recipiente, deve ser acondicionado em sacos plásticos à prova d'água.

5.5 Fluxograma dos procedimentos de diagnóstico

Cada laboratório possui o seu próprio fluxograma de encaminhamento das amostras destinadas ao diagnóstico. A seguir serão descritas as etapas de um protocolo-modelo (Figura 11.14):

- logo após o recebimento, o material deve ser removido da embalagem de transporte e acondicionado provisoriamente sob temperatura adequada (geralmente em geladeira a 4-6°C);
- a seguir, deve-se registrá-lo em um protocolo interno (livro ou arquivo);
- a próxima etapa é o encaminhamento para a realização do teste pertinente. O encaminhamento do material ao método indicado depende de uma análise preliminar que objetiva definir o agente(s) suspeito(s) e a metodologia a ser utilizada para diagnosticá-lo. Nessa etapa, o histórico que acompanha a amostra é fundamental para a tomada de decisão.

Ao se encaminhar a amostra para o diagnóstico, deve-se considerar outros possíveis patógenos e encaminhar parte do material para a bacteriologia, micologia, toxicologia entre outras (Figura 11.14).

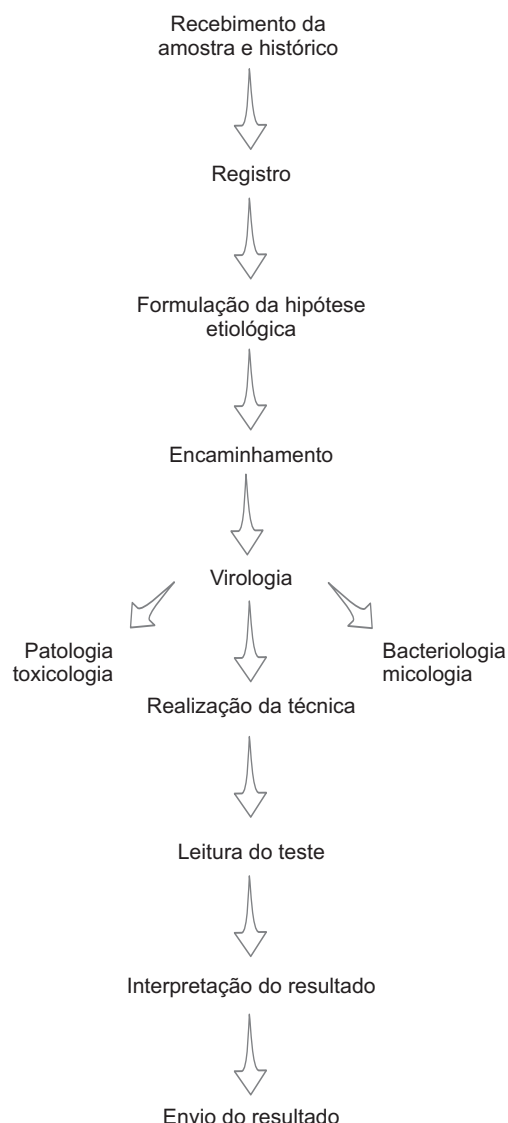


Figura 11.14. Fluxograma de procedimentos realizados na rotina diagnóstica.

Amostras de soro geralmente são acompanhadas de uma requisição específica (p. ex.: sorologia para BLV). Nesses casos, o encaminhamento é simples. Algumas vezes, as amostras são acompanhadas de um histórico clínico, sem a indicação do exame requerido. Nesses casos, o técnico deve definir, com base no histórico, qual o agente suspeito e encaminhar a amostra para o respectivo exame. Pode-se também contatar o veterinário que submeteu a amostra para inquire-lo sobre a natureza do exame solicitado. Em labora-

tórios que realizam testes sorológicos como parte de programas de monitoramento de rebanhos, é comum a submissão de centenas ou milhares de amostras de soro simultaneamente, as quais são diretamente encaminhadas para a realização dos testes a que se destinam.

Quando a amostra submetida é de outra natureza (tecidos, secreções, fetos), pode-se exigir uma análise mais detalhada do histórico para formular uma hipótese diagnóstica e encaminhar o material ao destino apropriado. Amostras desse tipo podem ser acompanhadas pela requisição de um determinado exame, o que simplifica a tomada de decisão. Cérebros de caninos ou bovinos são frequentemente enviados com a solicitação específica de diagnóstico de raiva; fezes bovinas são acompanhadas de uma requisição de diagnóstico para rotavírus; sêmen bovino é encaminhado para a pesquisa de herpesvírus, entre outros. Nesses casos, cabe ao técnico do laboratório simplesmente encaminhar o material para a realização do teste solicitado. Os tipos de exames a serem realizados para cada material (e para cada agente suspeito) são geralmente predeterminados pelo laboratório.

Outras vezes, o material é enviado sem a indicação de um agente suspeito e sem a requisição específica de um exame. Nesses casos, cabe ao laboratorista analisar o histórico e formular a hipótese etiológica a ser investigada. Com base nessa hipótese, indicará o exame mais apropriado. A formulação da hipótese e o encaminhamento correto do material exigem conhecimentos de Virologia, clínica, patogenia e epidemiologia das doenças víricas e nem sempre são tarefas fáceis. Especialmente nesses casos, um histórico detalhado reveste-se de grande importância. Em geral, a análise do histórico, realizada à luz dos conhecimentos acima mencionados, permite a formulação de uma hipótese, que pode envolver um ou mais agentes suspeitos. Assim, o encaminhamento deverá ser realizado objetivando a pesquisa e comprovação da hipótese. A seguir, serão mencionados alguns exemplos de procedimentos dessa natureza frequentemente adotados, e os direcionamentos indicados:

Caso 1. Material: secreções nasais.

Espécie: bovina.

Histórico: bezerros com sinais de doença respiratória.

Hipótese etiológica: quatro agentes virais são mais comumente associados com doença respiratória em bezerros: BoHV-1, bPI-3, BVDV e BRSV.

Encaminhamento: pesquisa de vírus por isolamento em cultivo celular.

Caso 2. Material: cérebro.

Espécie: bovina.

Histórico: doença neurológica seguida de morte.

Hipótese: dois agentes virais são mais frequentemente associados com doença neurológica em bovinos: o vírus da raiva e o BoHV-5.

Encaminhamento: inicialmente investiga-se o vírus da raiva por IFA. Em caso de resultado negativo, investiga-se o BoHV-5, por IFA em impressões de cérebro, PCR ou por isolamento viral.

Caso 3. Material: secreções nasais e raspados oculares.

Espécie: canina.

Histórico: filhotes com sinais respiratórios.

Hipótese: pode-se suspeitar de cinomose ou de outra virose respiratória (adenovírus, parainfluenza canina).

Encaminhamento: pode-se inicialmente pesquisar antígenos virais em células descamativas nas secreções ou raspados por IFA ou por métodos cromatográficos (*kits*). Posteriormente pode-se encaminhar para PCR ou isolamento, dependendo do protocolo de cada laboratório.

Caso 4. Material: feto abortado e membranas fetais.

Espécie: suína.

Histórico: rebanho com problemas de aborto, mumificações, natimortos.

Hipótese: dois agentes são mais comumente associados com perdas reprodutivas em suínos: o parvovírus e o PRRSV. No Brasil, ainda não foi

descrita a presença do PRRSV, então, deve-se, inicialmente, investigar o parvovírus.

Encaminhamento: pesquisa de atividade hemaglutinante (HA) nos tecidos, membranas e líquidos fetais.

Caso 5. Material: fezes.

Espécie: bovina.

Histórico: diarreia em bezerros com poucos dias de vida.

Hipótese: dois vírus são mais frequentemente associados com esses casos: o rotavírus e coronavírus.

Encaminhamento: pesquisa de partículas víricas por microscopia eletrônica.

Esses exemplos ilustram a importância do histórico clínico-patológico junto com a amostra submetida. A análise do histórico pode ser decisiva para direcionar o procedimento e mesmo para descartar possíveis suspeitos. Algumas vezes, amostras são enviadas sem o mínimo de informações, nem mesmo relativas à natureza do material ou à espécie animal do qual foram coletadas. Nesses casos, a formulação da hipótese e o encaminhamento do material ficam muito prejudicados, tornando muito difícil a obtenção do diagnóstico correto.

5.6 Processamento das amostras

Dependendo da natureza das amostras e dos testes a que se destinam, diferentes processamentos são realizados previamente à realização do exame. Para o isolamento de vírus em cultivo celular, fragmentos de tecidos ou órgãos devem ser macerados com areia estéril, homogeneizados e centrifugados à baixa rotação. O sobrenadante deve, então, ser inoculado. Secreções (nasais, oculares, genitais) devem ser centrifugadas para a remoção de debris celulares e sujidades; o sobrenadante deve ser inoculado. Material contaminado (secreções, conteúdo intestinal, fezes) deve ser filtrado em filtros acopláveis a seringas para remover bactérias e fungos contaminantes que possam interferir com o isolamento. As fezes devem ser previamente diluídas em meio de cultivo ou PBS para reduzir a sua toxicidade. O

sangue integral deve ser centrifugado à baixa rotação, e a capa flogística deve ser cuidadosamente removida, ressuspensa em meio de cultivo e inoculada nos cultivos. O sêmen deve ser diluído em soro fetal bovino (1:5 ou 1:10) para reduzir a toxicidade. Materiais destinados a outros métodos de diagnóstico são submetidos a um processamento apropriado a cada tipo de exame.

5.7 Interpretação dos resultados

Os resultados dos testes laboratoriais devem ser analisados conjuntamente com as informações que acompanham a amostra e interpretados à luz de conhecimentos de patogenia, clínica e epidemiologia. Se analisados isoladamente, podem conduzir a interpretações incompletas e conclusões equivocadas. A detecção de ácidos nucleicos do BoHV-5 por PCR no cérebro de bovinos acometidos de doença neurológica, por exemplo, não deve ser considerada prova definitiva do envolvimento desse vírus na etiologia deste caso de doença. Bovinos portadores da infecção latente possuem o DNA viral em várias partes do encéfalo, sem que isso tenha significado patológico ou que possa estar associado com ocorrência da doença em questão. Por outro lado, o resultado negativo em um determinado teste laboratorial não significa necessariamente que o material era realmente negativo, pois as técnicas apresentam certo limite de sensibilidade e podem, ocasionalmente, falhar em detectar o agente ou seus produtos. Da mesma forma, o resultado negativo no isolamento viral não descarta definitivamente o agente suspeito, pois condições inadequadas de coleta e conservação do material podem ter afetado negativamente a viabilidade do agente e prejudicado o teste. Por essas razões, os resultados laboratoriais devem ser considerados como uma parte de um conjunto de informações necessárias à elaboração do diagnóstico e não como o diagnóstico em si.

Em todas as situações, os resultados e a sua interpretação devem ser transmitidos com a maior brevidade possível ao pessoal que os requisitou, para que as medidas apropriadas – muitas vezes

dependentes dos resultados e de sua interpretação – possam ser adotadas.

6 Bibliografia consultada

- BAKER, J.C. Bovine respiratory syncytial virus: immunopathogenesis, clinical signs, diagnosis and prevention. **Infectious Diseases and Food Animal Practice**, v.8, p.62-68, 1993.
- CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic virology: a practitioner's guide**. St. Louis, MO: Mosby, 1992. 285p.
- d'OFFAY, J.M. et al. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.247-251, 1995.
- DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Medicine**, v.91, p.867-872, 1996.
- ELLIS, J.A.; HASSARD, L.E.; MORLEY, P.S. Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.206, p.354-361, 1995.
- ELLIS, J.A. et al. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhea virus in bovine abortions and neonatal death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.433-436, 1995.
- FENNER, F.J. et al. **Veterinary virology**. 2.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1993. 666p.
- FRESHNEY, R.J. **Culture of animal cells**. 2.ed. New York, NY: Wiley-Liss, 1987. 397p.
- GROOMS, D.L.; WARD, L.A.; BROCK, K.V. Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.830-833, 1996.
- HAINES, D.M.; CLARK, E.G.; DUBOVI, E.J. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine diarrhea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Veterinary Pathology**, v.29, p.27-32, 1992.
- HIRSCH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology**. Malden, MA: Blackwell Science, 1999. 480p.
- INNIS, M.A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, CA: Academic Press, 1990. 482p.
- KIRKBRIDE, C.A. **Laboratory diagnosis of livestock abortion**. 3.ed. Ames: Iowa State University Press, 1990, 260p.
- MAHY, B.W.S.; KANGRO, H.O. **Virology methods manual**. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 374p.
- MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia veterinária**. 2.ed. Porto Alegre: Sulina, 1981. 472p.
- McINTOSH, K. Diagnostic virology. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. Cap.14, p.401-430.
- MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A. **PCR: the polymerase chain reaction**. New York, NY: The Maple Press Company, 1994. 458 p.
- QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p.
- THORNBUR, P.M.; MURRAY, G. Dealing with unexpected or unknown emergencies: examples of Australian approaches. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.18, p.193-213, 1999.
- TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8.ed. New York, NY: Cornell University Press, 1988. 951p.
- TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Medicine**, v.91, p.858-866, 1996.
- VERSTEEG, J. **A colour atlas of virology**. Weert: Wolfe Medical Publications, 1985. 240p.
- ZHANG, Z. et al. Application of immunohistochemistry and in situ hybridization for detection of bovine coronavirus in paraffin-fixed intestines. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2964-2965, 1997.

1 Introdução	329
2 Formas de imunização	329
2.1 Imunização passiva	329
2.2 Imunização ativa	331
3 Objetivos da vacinação	331
4 Tipos de vacinas	332
4.1 Vacinas replicativas	333
4.1.1 Vacinas com vírus patogênico	334
4.1.2 Vacinas com vírus de espécie heteróloga	334
4.1.3 Vacinas com vírus atenuado	334
4.1.4 Vetores vacinais	339
4.2 Vacinas não-replicativas	342
4.2.1 Vacinas com vírus inativado	342
4.2.2 Vacinas de subunidades virais	343
4.2.3 Vacinas de proteínas recombinantes	344
4.2.4 Vacinas de peptídeos sintéticos	345
4.3 Vacinas de DNA e RNA	346
4.4 Vacinas monovalentes e polivalentes	347
5 Adjuvantes	347
6 Controle de qualidade	350
7 Conservação e administração de vacinas	350
8 Falhas vacinais	352
9 Reações adversas da vacinação	353
10 Drogas antivirais	354

11 Vacinas víricas licenciadas no Brasil	356
12 Bibliografia consultada	358

1 Introdução

No século 18, a varíola afetava e matava milhões de pessoas em todo o mundo. Naquela época, a prática utilizada para evitar a doença era a exposição das pessoas a uma pequena quantidade de material obtido de lesões cutâneas de varíola. Isto tinha como objetivo provocar uma infecção controlada, que seria seguida de resposta imunológica e proteção frente a uma nova exposição ao agente. A prática, conhecida como variolação, era originária da China e, embora bastante difundida nas áreas endêmicas, não era considerada segura, já que uma significativa parcela dos indivíduos que eram submetidos ao procedimento desenvolvia a doença após a exposição.

Em seus estudos sobre a varíola humana, o médico Edward Jenner observou que os ordenhadores de vacas afetadas pela varíola bovina não desenvolviam a forma humana da enfermidade, o que sugeria algum tipo de proteção cruzada. Em 1796, para comprovar a sua teoria, Jenner coletou material de lesões de varíola do úbere de uma vaca e o administrou a um menino de oito anos de idade. Alguns meses mais tarde, ele expôs esta criança ao vírus da varíola humana (*smallpox*) que, confirmando suas suspeitas, não produziu a doença. Jenner demonstrou, com esta prática, que a exposição prévia ao vírus da varíola bovina, um patógeno de baixa virulência, conferia proteção frente ao desafio com o vírus da varíola, antígenicamente relacionado ao vírus bovino, porém mais virulento. Posteriormente, na década de 1870, Louis Pasteur utilizou o termo vacina (do Latim, *vaccinia*; termo derivado de vaca) como forma de homenagem a Jenner, para designar a prática da administração de patógenos a indivíduos saudáveis com o objetivo de induzir resposta imunológica, numa época em que as bases teóricas da imunização ainda eram pouco conhecidas.

As vacinas consistem em microorganismos ou frações destes que, quando administradas a um indivíduo, induzem uma resposta imunológica capaz de proteger frente ao contato posterior com o agente original. A resposta imunológica que é induzida resulta do desenvolvimento de células efectoras e de células de memória. A va-

cinação constitui-se na estratégia mais efetiva de prevenção e controle de várias enfermidades humanas e veterinárias causadas por vírus. Diversas viroses animais e humanas já foram ou estão sendo controladas e erradicadas de países e continentes graças à vacinação. A varíola foi erradicada do mundo há três décadas. Doenças como a poliomielite e sarampo estão em vias de erradicação. Doenças animais como a febre aftosa, peste suína clássica, doença de Aujeszky, entre outras, também foram erradicadas de países e continentes inteiros pelo uso sistemático da vacinação.

A tecnologia empregada para a produção de vacinas contra vírus apresentou um valioso avanço com o domínio das técnicas de cultivo de células, a partir das quais foi possível otimizar a atenuação e a multiplicação de diversos agentes virais. No entanto, apesar dos avanços recentes na vacinologia, muito ainda pode ser obtido através da tecnologia de DNA recombinante, que permite a manipulação do genoma viral e a produção de vacinas cada vez mais eficientes e seguras. Entre os desafios para a indústria de imunobiológicos, está a adequação das tecnologias surgidas nas últimas décadas frente à demanda cada vez maior por segurança, bem-estar e produtividade.

2 Formas de imunização

O termo imunização se refere à indução de imunidade frente a um determinado agente ou antígeno. De acordo com a participação do sistema imunológico na produção dessa imunidade, dois tipos principais de imunização podem ser reconhecidos: imunização passiva ou ativa. A imunização passiva pode ser natural (pela placenta, colostro ou gema) ou artificial (administração de soro hiperimune). A imunização ativa ocorre pela exposição do animal ao agente infeccioso (infecção) ou por vacinação.

2.1 Imunização passiva

A imunização passiva resulta da transferência de anticorpos específicos pré-formados através da placenta ou do colostro materno ao filhote mamífero; da gema do ovo em aves, ou da administração de soro hiperimune. Nesses casos, não

há a produção de resposta específica pelo sistema imunológico do hospedeiro. Ao contrário, o hospedeiro recebe os anticorpos pré-formados. A imunidade passiva é de extrema importância para neonatos e em situações em que é necessária uma rápida resposta frente a um patógeno ou antígeno específico, como nos casos de exposição a toxinas ou doenças de caráter letal, como a raiva.

A capacidade de transferência de imunidade humoral através da placenta varia de acordo com características peculiares de cada espécie. A placenta humana, de outros primatas, de roedores e de carnívoros permite a transferência de anticorpos da classe IgG durante a gestação. A placenta de ruminantes, eqüídeos e suídeos, no entanto, é virtualmente impermeável à passagem de imunoglobulinas. Nessas espécies, a imunização passiva depende exclusivamente da ingestão do colostro nas primeiras horas de vida, quando o epitélio intestinal é permeável à absorção dessas moléculas. Neste caso, o período que os anticorpos serão capazes de proteger depende da quantidade de colostro ingerida pelo filhote em tempo hábil. A duração da imunidade passiva recebida pelo colostro varia entre as espécies e depende de vários fatores, incluindo o título de anticorpos maternos, concentração de imunoglobulinas no colostro, quantidade de colostro ingerida, quantidade de imunoglobulinas efetivamente absorvidas e taxa de crescimento corporal.

Por outro lado, a imunidade passiva pode interferir na produção de imunidade ativa resultante de uma subsequente vacinação dos animais jovens. Em geral, quanto maior a concentração plasmática de anticorpos maternos, menor será a eficácia da vacinação. A imunidade induzida por vacinas com vírus atenuado é menos afetada pela imunidade passiva do que a induzida por vacinas inativadas. A imunidade colostrar pode ser sistêmica, quando mediada por IgG que são absorvidas na mucosa intestinal e ganham acesso ao sangue. Por outro lado, IgAs ingeridas com o colostro podem conferir proteção local pela neutralização de microorganismos no lúmen intestinal. O decréscimo gradual dos níveis de anticorpos adquiridos passivamente é seguido pelo surgimento de anticorpos produzidos ativamente, frente à infecção natural ou vacinação (Figura 12.1).

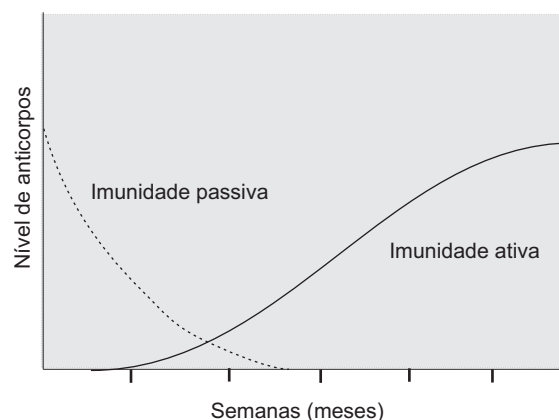


Figura 12.1. Evolução da imunidade passiva e ativa nas primeiras semanas/meses de vida.

A avicultura industrial é um bom exemplo da utilização em larga escala da imunidade passiva para o controle de doenças virais importantes. As fêmeas reprodutoras recebem várias doses de vacinas que visam proteger passivamente a sua progênie contra a infecção por alguns patógenos aos quais os pintos são expostos nos primeiros dias de vida. Apesar de ser inicialmente dispendioso, o custo-benefício deste programa de vacinação acaba sendo favorável, pois cada fêmea gera aproximadamente 150 pintos imunizados passivamente. Este tipo de imunidade é fundamental para a proteção dos pintos contra o vírus da doença infecciosa da bursa de *Fabrycius* (IBDV), reovírus das aves e vírus da encefalomielite aviária.

A vacinação de fêmeas, antes ou depois da cobertura, para induzir a produção de anticorpos que sejam posteriormente transferidos aos recém-nascidos pelo colostro, também é um método muito utilizado para prevenir doenças víricas de neonatos, como a rotavírose e coronavirose suína e bovina. Em tese, fêmeas imunes contra qualquer agente viral irão transferir essa imunidade aos fetos ou neonatos, conferindo proteção nas primeiras semanas de vida.

A resposta imunológica conferida pela imunização passiva é tipicamente de curta duração, pois é baseada nos anticorpos que são administrados e não na resposta do hospedeiro. Essa imunidade não possui memória e perdura somente o

período em que os anticorpos transferidos não são degradados pelo organismo do hospedeiro. Apesar dessas características, a imunidade passiva é fundamental não só para a defesa de neonatos, mas também em situações na quais é necessária uma resposta imediata. Para combater a infecção pelo vírus da cinomose (CDV), por exemplo, pode-se administrar soro hiperimune específico aos cães doentes, na tentativa de auxiliar o seu organismo a combater a infecção. Também os indivíduos expostos ao vírus da raiva (RabV) devem receber a aplicação do anti-soro específico, já que uma imunização ativa provavelmente não teria tempo hábil para proteger antes do final do período de incubação.

2.2 Imunização ativa

A imunidade ativa pode resultar tanto da exposição ao patógeno por infecção natural quanto da administração do antígeno em vacinas específicas. Como resultado, o sistema imunológico do hospedeiro é estimulado pelo antígeno ao qual foi exposto. A magnitude e duração da resposta imunológica dependem de fatores do hospedeiro, como a presença de anticorpos adquiridos passivamente, idade e imunocompetência do hospedeiro; e de vários fatores da vacina. Como regra, considera-se que a resposta imunológica mais efetiva e duradoura é aquela induzida pela infecção natural. Portanto, quanto mais as vacinas mimetizarem a infecção natural, melhor será a resposta imunológica. Por isso, acredita-se que as vacinas com vírus replicativos (ou vivos) sejam as mais efetivas, pois são as que mais se assemelham à infecção natural.

Além da vacinação clássica, outras formas de imunização ativa têm sido ocasionalmente utilizadas em alguns sistemas. Por exemplo, leitoas susceptíveis ao parvovírus suíno (PPV) podem ser expostas a fezes ou a ambientes contaminados com o vírus, de modo a adquirirem a infecção (que é benigna nesses animais) e se tornarem imunes. Posteriormente, se forem expostas ao agente durante a gestação, estarão imunizadas e os seus fetos estarão protegidos contra a infecção. Da mesma forma, alguns pecuaristas mantêm o hábito de expor os cordeiros às crostas de ectima

contagioso obtidas de ovinos adultos, buscando a proteção contra uma subsequente exposição ao vírus. Essas formas empíricas de imunização apresentam alguns riscos, pois podem expor os animais a outros agentes patogênicos, além da incerteza com relação à inocuidade do vírus administrado.

De acordo com o tipo de antígeno envolvido na exposição inicial, a imunidade resultante pode ser do tipo humoral, celular ou ambas. Na imunização passiva, a imunidade obtida é tipicamente humoral e de curta duração. Na imunização ativa, a resposta imunológica é geralmente de maior magnitude e duração. A maior duração da imunidade ativa deve-se principalmente à produção de linfócitos específicos de vida longa, chamados genericamente de linfócitos de memória.

3 Objetivos da vacinação

As vacinas são utilizadas com o objetivo de induzir a formação de uma resposta imunológica específica capaz de combater o agente frente a uma nova exposição. Assim, as vacinas devem ser efetivas – para induzirem proteção – e seguras, para não produzirem doença no hospedeiro. Nesse sentido, as vacinas inativadas são consideradas mais seguras se comparadas com as vacinas vivas atenuadas, uma vez que não ocorre replicação do agente ou risco de reversão à virulência. Por outro lado, os vírus presentes nas vacinas vivas possuem a capacidade de replicação no organismo hospedeiro, estimulando a imunidade humoral e celular. Por isso, as vacinas vivas (ou replicativas) são consideradas mais eficientes na indução de proteção.

A efetividade vacinal está relacionada com a capacidade de estimulação de células apresentadoras de antígenos, seguida da liberação das citocinas apropriadas. As vacinas devem estimular linfócitos T e B, gerando um número adequado de células de memória específicas para o antígeno inoculado. Devem ainda estimular a produção de linfócitos T auxiliares (Th) e T citotóxicos (Tc) específicos para diferentes epitopos do antígeno vacinal. O antígeno contido na vacina deverá persistir, preferivelmente, em locais específicos do tecido linfóide, permitindo que continue estimulando as células do sistema imunológico.

A indução de resposta imunológica mediada por linfócitos T (imunidade celular), que pode ser obtida de acordo com o tipo de vacina utilizada, é uma das mais efetivas defesas do organismo contra os vírus. Igualmente importante é a capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes, capazes de neutralizar os vírions circulantes e, dessa forma, evitar a infecção de novas células.

De modo ideal, espera-se que uma vacina seja capaz de conferir proteção prolongada do indivíduo frente a uma nova exposição ao agente, caracterizando a imunidade de longa duração. Espera-se, portanto, a estimulação de memória imunológica, que irá permitir uma resposta imunológica mais intensa frente a uma nova exposição ao vírus. Vacinas contra vírus de animais devem apresentar características específicas, tais como: facilidade de administração, custo de aquisição acessível, estabilidade do produto durante o armazenamento e, após a inoculação no organismo, adequação para programas de vacinação em massa e capacidade de estimular imunidade forte e duradoura. Devem ainda causar o menor número possível de efeitos colaterais, e não afetar o desempenho produtivo dos animais.

Em termos práticos, os objetivos da vacinação incluem: a) prevenir a infecção (imunidade esterilizante), o que é virtualmente impossível com as vacinas atuais. Mesmo em animais adequadamente vacinados, a exposição subsequente é seguida de replicação inicial do agente; b) prevenir a doença clínica e suas consequências (esse objetivo pode ser alcançado por várias vacinas animais); c) atenuar a doença clínica e suas consequências (para algumas viroses, as vacinas somente conseguem atenuar ou reduzir a intensidade e severidade dos sinais, reduzindo as consequências da doença); d) proteger o feto. Para várias viroses (diarréia viral bovina e parvovirose suína, por exemplo), as maiores consequências da infecção resultam das perdas fetais. Nesses casos, a vacinação objetiva imunizar as mães para que a sua resposta imunológica proteja e impeça a infecção fetal; e) proteger os neonatos. Para viroses que afetam os animais nas primeiras semanas de vida (rotavirose, coronavirose), a imunização das fêmeas visa conferir proteção

passiva aos recém-nascidos; f) reduzir a excreção viral. Animais vacinados, se posteriormente expostos ao agente, devem excretar o vírus em menores quantidades e por menos tempo, reduzindo, assim, a sua disseminação e transmissão; g) erradicar o agente da população. A vacinação contra determinados vírus, mais do que prevenir e/ou atenuar a doença clínica, objetiva criar, na população, uma imunidade protetora que torne inviável a circulação e perpetuação do agente. Esse tipo de cobertura denomina-se *imunidade de população* ou de *rebanho*.

Em situações em que o uso de imunógenos pode dificultar o diagnóstico sorológico da doença e, com isso, dificultar programas de controle ou erradicação, a decisão sobre o uso de vacinação deve ser criteriosamente avaliada.

4 Tipos de vacinas

Diferentes tipos de vacina contra vírus estão licenciados para uso veterinário, sendo a maioria composta por vírus inativados ou por vírus vivos atenuados. A utilização de novas tecnologias, principalmente envolvendo a manipulação genética (tecnologia de DNA recombinante), tem originado inúmeros estudos e expectativas no surgimento de novas opções de vacinas. Algumas vacinas recombinantes já estão no mercado, enquanto várias outras estão em fase de desenvolvimento ou de testes. Para algumas dessas vacinas, no entanto, muitos estudos ainda são necessários para a comprovação de sua segurança e eficácia; motivo pelo qual ainda possuem pouca participação no mercado veterinário. Por outro lado, algumas vacinas produzidas por métodos clássicos, há décadas, ainda conservam o seu espaço devido à sua eficácia e segurança. Vacinas autógenas de uso individual, produzidas com material coletado do animal a ser vacinado, são ainda uma das melhores formas de controle da papilomatose bovina e canina, demonstrando maior eficiência se comparadas com outros tipos de vacinas. Os diferentes tipos de vacinas contra vírus, já licenciadas ou ainda em fase de desenvolvimento, estão apresentados na Tabela 12.1.

Tabela 12.1. Tipos de vacinas víricas

Tipo		Características/propriedades
1. Replicativas (vírus vivo)	Vírus patogênicos	
	Vírus heterólogos	
	Vírus atenuados	Vírus naturalmente atenuados;
		Vírus atenuados por passagens em cultivo celular;
		Vírus atenuados por passagens em ovos embrionados;
		Vírus atenuados por passagens em espécie heteróloga;
		Vírus temperatura-sensíveis;
		Vírus modificados pela deleção de genes;
		Vacinas com marcadores antigênicos.
2. Não-replicativas (sem vírus vivo)	Vetores virais	
	Vírus inativado	
	Produtos de vírus	Subunidades de vírus;
		Proteínas recombinantes;
		Peptídeos sintéticos.
3. DNA/RNA		Contêm o gene da proteína de interesse.

4.1 Vacinas replicativas

São vacinas que contêm o vírus viável (vivo, replicativo) e, por isso, proporcionam a replicação do agente no organismo hospedeiro, resultando

na amplificação viral e no aumento da quantidade de antígeno que é apresentada ao sistema imunológico. Essas vacinas comportam-se de modo semelhante ao vírus em infecções naturais. Os vírus vivos podem ser utilizados como vacinas em diferentes apresentações (Figura 12.2).

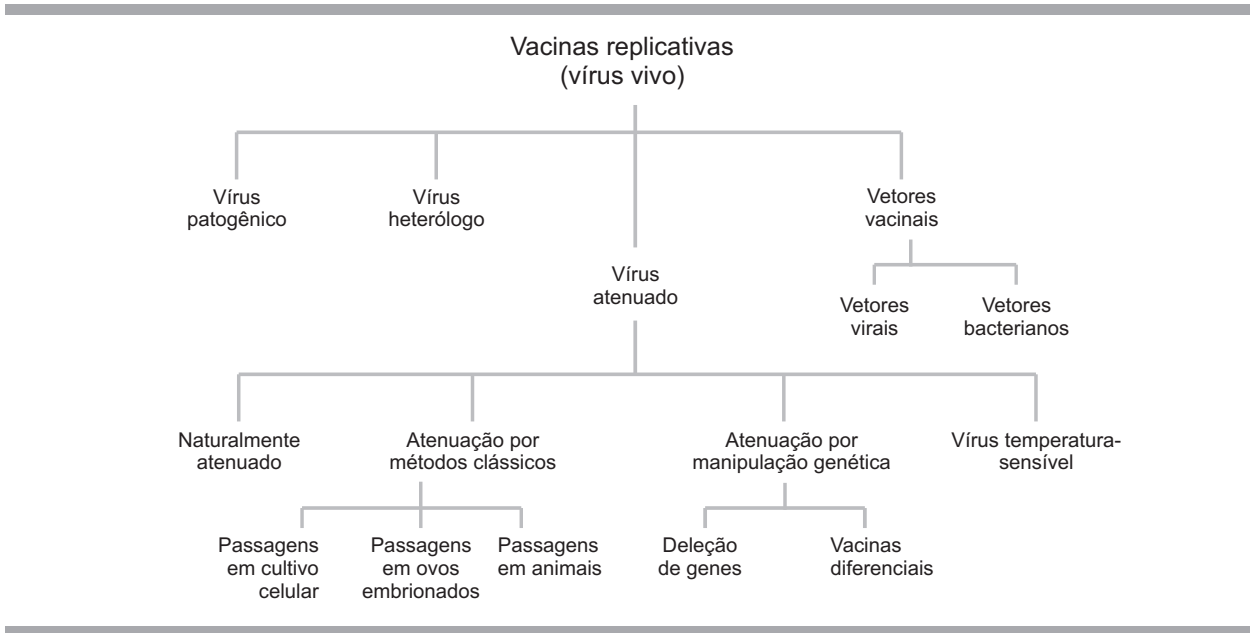


Figura 12.2. Tipos de vacinas que contêm o vírus viável, replicativo.

4.1.1 Vacinas com vírus patogênico

Em casos específicos, os próprios vírus com potencial patogênico, sem atenuação ou tratamento prévio, podem ser utilizados como vacina. Ovinos infectados pelo vírus do ectima contagioso apresentam lesões na região oral e focinho, desenvolvendo uma resposta imunológica protetora após a primeira exposição ao vírus. Ainda é freqüente a prática de expor os cordeiros às lesões de ectima contagioso (crostas), buscando induzir o desenvolvimento de imunidade. Este procedimento se assemelha muito à prática realizada na época da varíola humana. Outra forma de vacinação contra o ectima é o uso de uma vacina comercial contendo o vírus patogênico, porém inoculado através de escarificação na pele da face interior da coxa, onde o vírus não causa os sintomas indesejáveis. Para a parvovirose suína, a exposição prévia de leitoas primíparas às fezes de suínos adultos (que provavelmente já entraram em contato com o vírus) pode conferir imunidade e prevenir a ocorrência de perdas reprodutivas, caso sejam infectadas posteriormente, durante a gestação.

4.1.2 Vacinas com vírus de espécie heteróloga

Alguns vírus, que são antígenicamente relacionados com outros vírus, podem ser utilizados para induzir imunidade em determinadas espécies nas quais não causam doença. O poxvírus bovino é antígenicamente semelhante ao vírus da varíola humana e, como comprovado pelos estudos clássicos de Jenner, pode induzir imunidade em humanos. Os poxvírus de outras espécies de aves também têm sido utilizados para induzir proteção de galinhas contra a boubá (varíola aviária). Um herpesvírus de perus já foi utilizado para imunizar galinhas contra a doença de Marek, causada por um herpesvírus antígenicamente relacionado. Da mesma forma, o rotavírus bovino já foi utilizado para imunizar suínos contra a rotavirose suína. O vírus da parainfluenza 3 de bovinos já foi utilizado para imunizar crianças contra o vírus da parainfluenza 3 de humanos. Nesses casos, o vírus vacinal é apatogênico para

a espécie vacinada e induz proteção cruzada contra um vírus antígenicamente semelhante ao da espécie.

4.1.3 Vacinas com vírus atenuado

Vírus que apresentam maior patogenicidade e virulência precisam ser submetidos a procedimentos específicos para reduzir o seu potencial patogênico e viabilizar a sua utilização como vacinas replicativas. Do contrário podem produzir doença e, até mesmo, mortalidade nos animais vacinados. Esses procedimentos devem preservar as suas características antigênicas e a capacidade replicativa. A redução do potencial patogênico do agente denomina-se genericamente *atenuação*, e o agente com a patogenicidade reduzida é dito *atenuado*. As vacinas que contêm o vírus replicativo, capaz de se multiplicar no organismo do animal inoculado, são denominadas genericamente de vacinas vivas, vacinas atenuadas ou vacinas com vírus vivo modificado.

Em geral, os vírus vacinais atenuados replicam nos tecidos próximos ao local da inoculação, produzem pouca ou nenhuma disseminação sistêmica e, por isso, geralmente não produzem doença nos animais vacinados, ou seja, a vacinação com vírus atenuado se constitui em uma infecção controlada ou restrita.

A imunidade conferida por vacinas atenuadas é, geralmente, de maior magnitude, amplitude (resposta celular e humoral) e duração do que a imunidade induzida pelas vacinas com vírus inativado. Vacinas atenuadas estão disponíveis contra a doença de Marek das galinhas, parvovirose e cinomose canina, rinotraqueíte felina, encefalomielite aviária, rinotraqueíte infecciosa e diarreia viral bovina, entre muitas outras.

A imunidade conferida é geralmente prolongada e reduz ou mesmo elimina a necessidade de se realizar revacinações com a mesma vacina. A resposta vacinal será melhor quando a vacina for capaz de mimetizar a infecção natural e estimular uma resposta imunológica específica; de magnitude, espectro e duração adequados. As vacinas de vírus atenuados têm a capacidade de induzir uma replicação viral limitada no organismo hospedeiro, que, no entanto, é de boa amplitude e

capaz de estimular resposta imunológica sem resultar no desenvolvimento de sinais clínicos importantes. O tipo de imunidade obtido é aquele considerado ideal para uma vacina, havendo estimulação dos mecanismos da resposta imunológica inata e adaptativa. Nesta última, são geradas respostas celular (linfócitos Th e Tc) e humoral (linfócitos B, anticorpos), além de imunidade de mucosas, o que é conveniente no caso de se buscar proteção contra uma infecção natural que ocorra em superfícies mucosas.

Esse tipo de vacina, entretanto, não é considerado totalmente seguro para todos os vírus, em razão da possibilidade, embora rara, de reversão à virulência da cepa viral original. Por esse motivo, a sua administração não é recomendada para indivíduos imunodeprimidos, nos quais pode causar a doença. Cabe ressaltar que as mutações que são induzidas nos processos de atenuação viral são produzidas ao acaso e, na maioria das vezes, são desconhecidas. Isso significa que é difícil prever as circunstâncias nas quais poderia ocorrer a reversão à virulência. Por exemplo, algumas cepas atenuadas de vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas (ILTV) são capazes de reverter-se à forma virulenta após algumas passagens em aves não vacinadas. Dessa forma, a utilização dessa vacina é reservada somente para as regiões onde o vírus é endêmico ou em surtos da doença. Vacinas atenuadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) retêm a sua capacidade de infectar o feto e causar perdas reprodutivas, por isso não devem ser administradas a fêmeas prenhes.

Os vírus atenuados utilizados em vacinas podem ser pouco patogênicos naturalmente ou podem ser atenuados por métodos artificiais. A maioria das vacinas atenuadas disponíveis atualmente foi obtida pela atenuação proposital do agente, por diferentes métodos.

4.1.3.1 Vírus naturalmente atenuado

Determinadas cepas virais são naturalmente pouco virulentas e, assim, podem ser utilizadas em vacinas vivas sem a necessidade de atenuação prévia. Um exemplo está na utilização de vírus dos sorotipos 2 e 3 do vírus da doença de

Marek, para proteger os pintos contra o sorotipo 1 oncogênico. O sorotipo 2 pode ser isolado de galinhas, e o tipo 3 pode ser isolado de perus, sendo ambos apatogênicos, mas capazes de proteger as galinhas contra os tumores induzidos pelo vírus patogênico. Provavelmente a grande maioria dos vírus animais apresente alguma cepa pouco virulenta circulando na população ou naturalmente atenuada e que poderia ser utilizada como vacina. No entanto, o procedimento mais utilizado para a produção de vacinas atenuadas é a indução de atenuação de cepas originalmente patogênicas.

4.1.3.2 Atenuação por passagens em cultivo celular

Em 1974, foi desenvolvida uma vacina atenuada contra a varicela, a partir de uma cepa viral denominada Oka, obtida de um isolado clínico do vírus da varicela-zoster (VZV). Essa cepa foi propagada sucessivamente em cultivos de fibroblastos de embrião de cobaias e em células WI38. O objetivo da propagação em cultivo celular era obter a atenuação do vírus, de modo a adaptá-lo a um ambiente diferente daquele encontrado no hospedeiro natural, sem eliminar a capacidade de replicação viral. No caso da cepa Oka, utilizada na profilaxia da varicela, a vacina resultante é capaz de induzir uma forte imunidade frente ao vírus sem produzir sinais clínicos nos indivíduos vacinados, ou seja, o vírus vacinal é desprovido de patogenicidade e virulência, propriedades que caracterizam a atenuação viral.

Seguindo esse mesmo princípio, passagens sucessivas de vírus em cultivos de células se constituem, atualmente, na maneira mais comum de se obter atenuação de vírus para uso em vacinas. Essa prática tem sido adotada para a atenuação da maioria das vacinas víricas vivas disponíveis para uso veterinário. As passagens podem ser realizadas em linhagens celulares de espécies diferentes daquela para a qual a vacina se destina. Alternativamente, pode-se realizar passagens em células da mesma espécie, porém de tecido ou órgão diferente daqueles infectados naturalmente pelo vírus. Uma das formas de se obter a atenuação do CDV, que naturalmente infecta células

linfóides, é a realização de passagens sucessivas do vírus em cultivo de células renais de origem canina.

Após várias passagens em cultivo celular, existe uma tendência ao acúmulo de mutações pontuais no genoma viral, e a frequência dessas mutações é maior nos vírus RNA. O acúmulo de mutações, algumas provavelmente em genes associados com a virulência, eventualmente resulta na atenuação do vírus, ou seja, o vírus se adapta aos cultivos e perde algumas funções necessárias para a sua virulência na espécie hospedeira. Uma vez atenuado, este vírus pode ser utilizado em vacinas. Uma das maiores restrições a esse tipo de vacina é o desconhecimento da base genética da atenuação. Se a atenuação for devida a uma ou a poucas mutações, existe o risco de reversão ao fenótipo virulento após a administração ao animal. Dentre as vacinas víricas com vírus vivo de uso humano e veterinário, a grande maioria foi obtida por este método.

4.1.3.3 Atenuação por passagens em ovos embrionados

A realização de múltiplas passagens em embriões de galinha também tem sido utilizada como forma de se atenuar vírus para uso em vacinas. Esse procedimento pode ser utilizado tanto para vírus de aves como para vírus de mamíferos que replicam em embriões de galinha. Dentre os vírus aviários que foram atenuados por passagens em ovos embrionados destacam-se o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) e o vírus da influenza. Vacinas contra a influenza de mamíferos (suínos e eqüinos) também foram produzidas pela atenuação do vírus em ovos embrionados. A exemplo das vacinas atenuadas por passagens em cultivos celulares, a restrição maior desse tipo de vacina é o desconhecimento da base genética da atenuação, havendo o risco potencial de reversão à virulência.

Além de vírus aviários, diversos outros vírus podem ser atenuados desse modo. Vacinas atenuadas através da passagem do vírus em embriões de galinha já foram produzidas contra o CDV, vírus da língua azul (BTV) e da raiva (RabV). A redução da virulência, após um deter-

minado número de passagens, pode ser confirmada por ensaios laboratoriais e pela inoculação do vírus na espécie de interesse. Essa é uma etapa indispensável para a certificação da vacina como atenuada e estável.

4.1.3.4 Atenuação por passagens em espécie heteróloga

Os vírus destinados para uso em vacinas também podem ser atenuados por múltiplas passagens em uma espécie heteróloga, geralmente animais de laboratório (coelhos, camundongos, cobaias). Esse método, embora seja pouco prático e cada vez menos desejável quando comparado ao uso de cultivo celular, é o mais adequado para a atenuação de determinados vírus, como o RabV e alguns arbovírus.

A espécie animal utilizada para a atenuação viral pode também ser próxima à espécie para a qual a vacina é destinada. Vacinas contra o CDV podem ser atenuadas por passagens sucessivas do vírus em furões. Já a cepa chinesa do vírus da peste suína clássica (CSFV), mundialmente utilizada como vacina viva, foi atenuada por passagens sucessivas em coelhos. Há algumas décadas, vacinas contra a raiva eram produzidas pela inoculação sucessiva em cérebro de coelhos.

4.1.3.5 Vírus temperatura-sensíveis (TS)

Vírus atenuados para uso em vacinas podem também ser obtidos pela seleção de variantes que apresentam capacidade limitada de replicar sob temperatura corporal (37°C), mas que replicam com eficiência sob temperaturas mais baixas (30-33°C). Os vírus que apresentam essas características são denominados vírus TS. Para a obtenção dos variantes TS, o vírus é cultivado em células sob temperaturas mais baixas que a temperatura do organismo hospedeiro (geralmente 30-33°C). Isso resulta na seleção de variantes virais capazes de replicar eficientemente nessa temperatura. Esses vírus, geralmente, não são capazes de replicar à temperatura corporal e, por isso, não causam infecção sistêmica quando administrados ao hospedeiro. Esse tipo de vacina possui aplicação especial em viroses respiratórias, como a influenza

(gripe) humana e na infecção pelo BoHV-1 em bovinos.

As vacinas TS são geralmente indicadas para administração intranasal. Após a administração, o vírus vacinal replica próximo à superfície corporal (na mucosa nasal), onde a temperatura é inferior à temperatura corporal. Uma vacina TS contra o vírus da influenza foi licenciada para uso humano nos Estados Unidos, enquanto uma vacina TS contra o BoHV-1 já é utilizada em vários países, inclusive no Brasil. Uma das principais vantagens das vacinas TS contra o BoHV-1 é a segurança, pois o vírus vacinal infecta as células do local da inoculação, mas não é capaz de replicar à temperatura corporal. Com isso, o BoHV-1 TS é teoricamente incapaz de se disseminar de forma sistêmica e infectar o feto, cuja infecção pode causar aborto.

4.1.3.6 Vírus atenuados por deleção de genes

Quando os genes envolvidos na virulência de um vírus são conhecidos, é possível introduzir alterações direcionadas no genoma viral através de manipulação genética. Vacinas *deletadas* são obtidas pela remoção ou inativação de genes relacionados com a virulência, utilizando técnicas de DNA recombinante. Os mutantes virais que são produzidos preservam a capacidade de replicação e, por isso, retêm a sua capacidade imunogênica. No entanto, são incapazes de causar doença porque apresentam pouca ou nenhuma virulência.

O vírus deve se manter viável após a manipulação genética e a estabilidade desta mutação pode ser evidenciada após várias passagens em cultivo celular. Como em qualquer outra metodologia empregada para se obter a atenuação viral, sempre existe a preocupação de evitar a reversão para a forma virulenta. Assim, procura-se fazer a exclusão de um gene inteiro ou de mais de um gene de virulência no mesmo vírus, sempre preservando a capacidade de replicação viral. Essa estratégia reduz a possibilidade de o vírus recuperar a virulência e torna a vacina deletada mais segura do que as demais vacinas de vírus atenuados.

A atenuação que pode ser obtida nos herpes-vírus é um bom exemplo da produção de vacinas atenuadas por deleção. Esses vírus possuem um gene que codifica a enzima timidina quinase (TK), associada com a capacidade do vírus de replicar em neurônios e ser neurovirulento. Já os genes que codificam as glicoproteínas do envelope gE, gI e gC não são essenciais à viabilidade e replicação viral. A eliminação do gene da TK produz um vírus mutante atenuado, com capacidade reduzida ou nula de produzir infecções neurológicas. A deleção simultânea de outro gene resulta em um vírus vacinal ainda mais atenuado e mais seguro e, ao mesmo tempo, capaz de estimular a resposta imunológica do hospedeiro. No Brasil, uma vacina atenuada obtida por *deleção* de genes (gE negativa) está licenciada para uso contra a doença de Aujeszky dos suínos. Outras vacinas desse tipo encontram-se em desenvolvimento para o BoHV-1 e BoHV-5. Vacinas contra alguns poxvírus animais também foram obtidas pela deleção do gene da TK, enzima que também está envolvida na capacidade de replicação e virulência desses vírus.

4.1.3.7 Vírus com marcadores antigênicos

Vacinas com marcadores antigênicos – também denominadas vacinas diferenciais – são aquelas que induzem uma resposta sorológica nos animais vacinados que pode ser distinguida da resposta à infecção natural (Figura 12.3). Essas vacinas são muito úteis em programas de controle e erradicação de infecções víricas que produzem infecções persistentes ou latentes. Nesses programas, a vacinação é utilizada paralelamente a outros procedimentos, como a identificação e eliminação dos animais portadores. Nesses casos, é crítico que se diferenciem os animais vacinados daqueles que são portadores do vírus. O caráter diferencial em um vírus vacinal geralmente é obtido pela deleção do gene que codifica uma proteína do envelope do vírion. A diferenciação é realizada pelo uso de um teste sorológico – geralmente um teste de ELISA – que detecta anticorpos contra a proteína ausente no vírus vacinal, mas presente no vírus de campo. Ou seja, a detecção de anticorpos específicos contra esta proteína

indica que os animais foram infectados com o vírus de campo. Animais somente vacinados não reagem positivamente no teste.

As vacinas diferenciais são comercializadas acompanhadas do teste diagnóstico específico, que permite diferenciar a resposta vacinal da resposta induzida pelo vírus de campo. Esta estratégia possibilita a implantação de programas

de vacinação em áreas de risco, sem prejudicar a perda da condição de rebanho livre ou prejuízo ao trânsito de animais.

Como citado anteriormente, na vacina diferencial licenciada contra a doença de Aujeszky, o herpesvírus suíno (PRV) sofreu a *deleção* do gene da glicoproteína E (gE). Esta glicoproteína, além de não ser essencial à replicação do vírus, é capaz

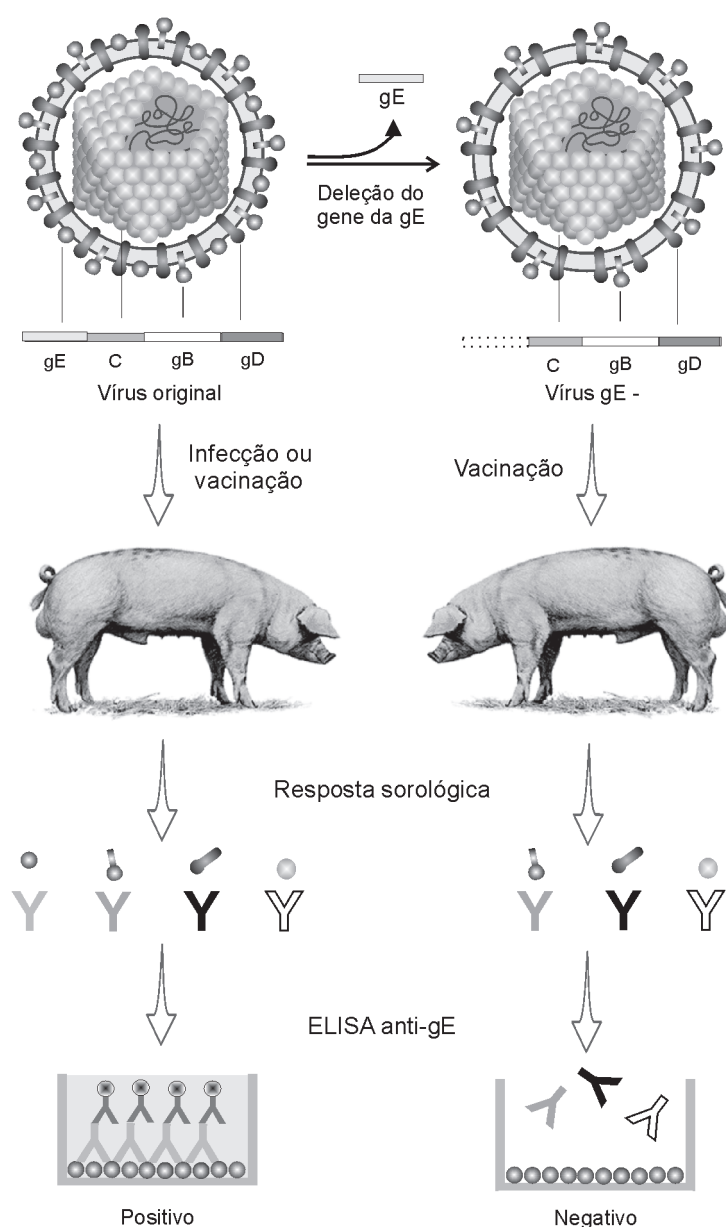


Figura 12.3. Princípio das vacinas com marcadores antigênicos. O gene que codifica uma proteína estrutural não-essencial é deletado do genoma por manipulação genética, originando um vírus mutante que não expressa a referida proteína. Este vírus mutante é usado como vacina. O uso de um teste imunoenzimático específico que detecta anticorpos contra a proteína deletada permite distinguir os animais vacinados (não reagem no teste) dos animais infectados com o vírus de campo (reagem positivamente no teste). O exemplo se refere à vacina diferencial contra o PRV, em que o gene da glicoproteína E (gE) foi deletado.

de induzir a produção de anticorpos no hospedeiro. Portanto, animais vacinados com a cepa gE negativa não formarão anticorpos específicos contra esta glicoproteína, mas os animais que forem infectados com o vírus de campo desenvolverão anticorpos contra a gE. Através do teste imunoenzimático, fornecido com a vacina, pode-se, subsequente, diferenciar os suínos vacinados daqueles infectados pelo vírus de campo.

Por suas características, as vacinas diferenciais são adequadas para programas de controle e erradicação de infecções, já que não impedem o trânsito e comércio de animais. A erradicação da PRV, na Alemanha e em outros países europeus, foi obtida com o uso de vacinas diferenciais. O programa de erradicação da PRV, nos Estados Unidos, em fase final de execução, também se valeu dessa estratégia. No Brasil, o programa de erradicação dessa doença, em Santa Catarina, utilizou uma vacina deletada na gE, associada com um teste imunoenzimático. Vacinas diferenciais estão sendo utilizadas em vários países europeus em programas de controle e erradicação do BoHV-1. A possibilidade de se manipular geneticamente os vírus e modificá-los antigenicamente abre a possibilidade da confecção e utilização deste tipo de vacina contra outros vírus animais. O princípio das vacinas *deletadas* diferenciais e a sua utilização para diferenciar animais vacinados daqueles infectados com o vírus de campo está ilustrado na Figura 12.3.

Embora as vacinas diferenciais clássicas tenham sido concebidas para utilização do vírus deletado como vacina viva, o vírus com marcador antigênico pode também ser utilizado em uma vacina inativada. Da mesma forma, vacinas de subunidades e vacinas de vetores também permitem a diferenciação entre animais vacinados e infectados naturalmente. Ou seja, o caráter diferencial pode ser obtido tanto por vacinas vivas ou inativadas geneticamente manipuladas como por vacinas de subunidades ou de vetores.

Em algumas vacinas tradicionais, é possível se diferenciar a resposta vacinal da resposta à infecção. Um exemplo é a vacina inativada contra o vírus da febre aftosa (FMDV). Utilizando um teste que detecta anticorpos contra uma proteína do vírus produzida durante a sua replicação, é possível reconhecer os animais que foram infectados

e diferenciá-los daqueles que foram vacinados, pois a referida proteína é retirada da formulação vacinal durante o seu processamento.

4.1.4 Vetores vacinais

Vírus natural ou artificialmente atenuados podem ser utilizados para carrear um ou mais genes que codificam antígenos virais imunoprotetores de outros vírus. Esses vírus funcionam, assim, como vetores vivos para a imunização de animais. O gene de interesse pode ser inserido no genoma do vírus vetor por manipulação genética. O resultado é um microorganismo recombinante que expressa as suas próprias proteínas e também a proteína heteróloga. Como consequência, a vacinação com este vírus induz resposta imunológica contra as proteínas do vetor e também contra a proteína do vírus heterólogo.

Os vetores de eleição devem possuir capacidade replicativa, porém devem ser pouco ou nada patogênicos. De preferência, os vírus vetores devem replicar e estimular a resposta imunológica em sítios equivalentes aos infectados pelo vírus de interesse. Dessa forma, a resposta imunológica será produzida nos locais naturais de infecção. Em geral, os vetores virais utilizados são aqueles que já têm o genoma sequenciado e caracterizado, além de serem capazes de receber a inserção do gene heterólogo que irá codificar o antígeno de interesse. Sendo assim, os poxvírus, os herpesvírus e os adenovírus são os vírus mais frequentemente empregados como vetores vacinais. Além desses, diversos outros vírus vêm sendo estudados como vetores para vacinas humanas e animais, como os alfavírus (vírus da encefalite equina venezuelana [VEEV], vírus Sindbis), flavivírus (vírus da febre amarela) e o poliovírus (cepa atenuada Sabin, a mesma que é utilizada contra a poliomielite).

O vírus da varíola das galinhas, pertencente à família *Poxviridae*, é utilizado como vetor de antígenos do vírus da doença de Newcastle (NDV) das aves, recentemente licenciada nos EUA. Ou seja, a imunização das aves com o vetor vacinal induz proteção contra o NDV. O vírus vaccinia e o vírus da boubas dos canários, também poxvírus, são exemplos de vetores virais utilizados em vacinas já comercializadas no Brasil e em outros

países. O vírus da bouba dos canários apresenta baixo índice de replicação e incapacidade de disseminação quando inoculado em células de mamíferos. Esse vírus também é capaz de expressar antígenos heterólogos de maneira muito eficiente e, por este motivo, é usado como vetor para vacinas destinadas a outras espécies animais.

Um exemplo de uso desse vírus é a vacina recombinante contra a cinomose canina, já disponível no comércio. Os genes das glicoproteínas hemaglutinina (H ou HA) e de fusão (F) do CDV foram inseridos no genoma do poxvírus do canário, que é multiplicado até atingir altos títulos. O

vírus recombinante é, então, utilizado para imunizar cães. O resultado é a indução de resposta imunológica contra os antígenos do poxvírus – irrelevante neste caso, pois este não é um vírus de cães – mas principalmente contra as proteínas H e F, conferindo proteção aos cães contra o CDV (Figura 12.4). O poxvírus do canário também serve de vetor para vacinas contra o vírus do Nilo Ocidental (WNV) para uso em equinos.

A raiva em carnívoros silvestres da Bélgica e França tem sido controlada com o emprego de um vetor poxvírus (vaccinia) expressando a glicoproteína G do RabV. Esta vacina – de administração

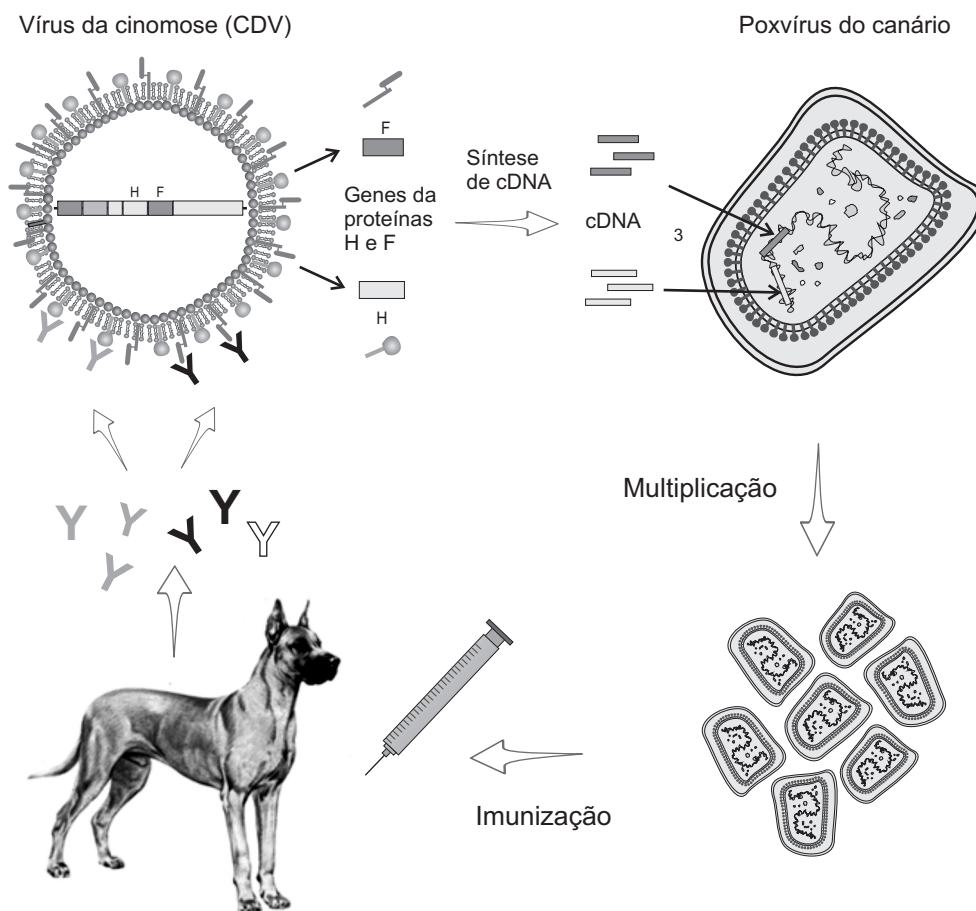


Figura 12.4. Princípio das vacinas replicativas baseadas em vetores virais. Os genes de proteínas estruturais imunogênicas do vírus de interesse são sintetizados como cDNA e inseridos no genoma de um vírus vetor, geralmente de outra espécie animal. Este vírus vetor é amplificado em cultivo celular até atingir altos títulos e, então, utilizado para imunizar os animais da espécie de interesse. Os animais imunizados desenvolvem resposta imunológica contra as proteínas do vírus vetor e contra a proteína heteróloga, conferindo proteção contra o vírus de interesse. O exemplo se refere à vacina contra a cinomose, em que as glicoproteínas H e F do CDV foram inseridas no genoma do poxvírus do canário, que é, então, utilizado para imunizar cães.

oral – é fornecida por meio de iscas alimentares distribuídas nas florestas. As raposas que receberam a vacina não apresentaram sinais clínicos de raiva ou lesões de pox. A raiva silvestre em vários países europeus tem sido controlada pelo uso desta vacina.

Os adenovírus bovino, ovino e suíno são também bons vetores vacinais, pois são vírus de manipulação relativamente fácil e de genoma bem caracterizado, que permite a inserção de grandes seqüências de genes sem necessitar a remoção de seqüências originais do vírus. Os adenovírus apresentam tropismo para diferentes tipos celulares e facilidade de replicar em altos títulos em cultivos celulares. Esta estratégia foi utilizada para a produção de uma vacina contra a FMDV, na qual um adenovírus humano não-replicativo expressa proteínas do capsídeo do FMDV. Uma vacina contra o papiloma genital humano – causador do carcinoma de colo de útero – foi produzida pela inserção de genes do papilomavírus humano no genoma de um adenovírus. Uma vacina contra a gripe humana foi produzida utilizando um adenovírus não replicativo como vetor para a hemaglutinina do vírus da influenza.

Os herpesvírus também têm sido explorados como vetores potenciais para carrear antígenos de outros vírus pela facilidade de atenuá-los (por deleção de genes) e pela grande capacidade do genoma (permite a inserção de um ou mais genes). Dentre os usos experimentais de herpesvírus como vetores vacinais incluem-se: BoHV-1 expressando antígenos do RabV, do BVDV e do vírus sincicial respiratório bovino (BRSV). O resultado é uma vacina polivalente para bovinos que estimula o sistema imune no local de entrada desses vírus.

Uma das características desejáveis nos vetores virais é a ausência de excreção – ou excreção mínima – do vírus no ambiente. No caso dos vetores de herpesvírus, existe ainda a preocupação com a possibilidade do vírus vetor estabelecer latência no animal vacinado. Estudos realizados com o herpesvírus canino (CHV) como vetor vacinal para uso em raposas demonstraram que, embora o vírus tenha sido detectado nos sítios de latência, não foi observada a reativação viral.

O genoma do herpesvírus suíno apresenta boas características para a inserção de genes heterólogos e, por isso, vem sendo utilizado experimentalmente como vetor para genes de outros vírus suínos, como o CSFV e o circovírus suíno (PCV). O resultado é um herpesvírus atenuado que atua como vacina multivalente e apresenta ótimas perspectivas para vacinação em suínos. O herpesvírus suíno também pode ser utilizado como vetor para outras espécies animais, havendo estudos que o utilizam como vetor de genes do FMDV.

As vacinas que utilizam vetores virais apresentam a vantagem de não sofrerem interferência da imunidade passiva materna, pois os animais geralmente não possuem imunidade contra antígenos do vírus vetor. Da mesma forma, se o vírus vetor for um vírus não-patogênico para a espécie animal vacinada, não existe o risco de tornar-se virulento. Eles também são boas alternativas de vacinas contra vírus que replicam de maneira insatisfatória em cultivos celulares. Conforme o local de replicação do vetor utilizado, haverá o estímulo de imunidade de mucosas (penetração em mucosas) ou imunidade mediada por linfócitos T (penetração intracelular). Certamente, novas vacinas de vetores virais serão incorporadas ao mercado nos próximos anos, pelas vantagens e aplicações potenciais que apresentam.

Algumas bactérias também podem ser utilizadas como vetores para a expressão de antígenos virais. Nesse caso, o gene que codifica uma proteína viral imunoprotetora pode ser inserido no genoma bacteriano, através de manipulação genética. A bactéria recombinante é, então, amplificada em cultura e administrada pela via oral ao hospedeiro. Ao atingir o intestino, a bactéria se multiplica e produz o antígeno viral, que é apresentado ao sistema imunológico. Enterobactérias, como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella*, são consideradas boas candidatas a vetores de antígenos de vírus entéricos devido à perspectiva de apresentação do antígeno viral diretamente no tecido linfóide que está associado ao intestino. Vetores bacterianos para antígenos virais apresentam boas perspectivas para uso em humanos, pois além de induzirem resposta imunológica lo-

cal (IgA), podem ser administrados pela via oral, o que também representa uma vantagem.

4.2 Vacinas não-replicativas

As vacinas não-replicativas não contêm o agente viável e, por isso, são mais seguras do que as vacinas com vírus replicativo. Assim, não oferecem a possibilidade de reversão à virulência e de causar doença. No entanto, por não resultarem em amplificação do antígeno – como ocorre com as vacinas vivas – e por não induzirem resposta mediada por linfócitos Tc, apresentam efetividade geralmente inferior às vacinas com vírus replicativo. No entanto, essas vacinas possuem inúmeras aplicações e têm contribuído para o controle e erradicação de várias doenças víricas importantes, como a febre aftosa. Várias vacinas não-replicativas estão disponíveis no mercado e outras tantas estão em fase de desenvolvimento ou testes. As vacinas não-replicativas podem ser compostas por vírions inativados, por frações ou proteínas extraídas dos vírions, por proteínas virais recombinantes, por peptídeos sintéticos correspondentes aos determinantes antigênicos imunoprotetores das proteínas e, finalmente, por DNA ou RNA que codifica a proteína de interesse (Figura 12.5). Dentre estas, a maioria contém partículas víricas íntegras, porém desprovidas de infectividade (vacinas inativadas ou “mortas”).

4.2.1 Vacinas com vírus inativado

Vacinas inativadas, também chamadas de vacinas mortas, são obtidas a partir do vírus infectivo original, que passa pela eliminação irre-

versível da sua infectividade por métodos físicos ou químicos. São, portanto, vacinas compostas de partículas víricas íntegras, porém inertes e sem capacidade replicativa. São consideradas vacinas seguras porque possíveis vírus contaminantes, se presentes no estoque original de vírus, são também inativados durante o processo de inativação. Além disso, após a inativação, não existe possibilidade de retorno do vírus vacinal à forma virulenta.

Para a produção da vacina, o vírus é inicialmente amplificado em um sistema biológico (cultivo celular, ovos embrionados) até atingir altos títulos. Esses vírus são, então, submetidos ao processo de inativação, que objetiva eliminar a sua viabilidade. Durante a eliminação da capacidade infectiva do vírus, procura-se preservar a capacidade antigênica, de modo que a resposta imunológica seja devidamente estimulada. A manutenção da integridade da conformação dos antígenos imunoprotetores é um fator que pode influenciar na resposta imunológica. Produtos químicos, como o formaldeído, etilenimina e β -propiolactona, são utilizados para inativar vírus para uso em vacinas. Esses químicos, contudo, se empregados em concentrações e tempo excessivos, podem alterar a conformação de epitopos virais e, conseqüentemente, resultar em redução da imunogenicidade do antígeno. Atualmente, a β -propiolactona e os derivados da etilenimina são os inativantes mais utilizados pela indústria de vacinas.

A imunidade decorrente da aplicação de vacinas inativadas é tipicamente humoral, uma vez que as partículas inativadas são incapazes de replicar no organismo hospedeiro e, deste modo, desencadear a resposta celular mediada por lin-

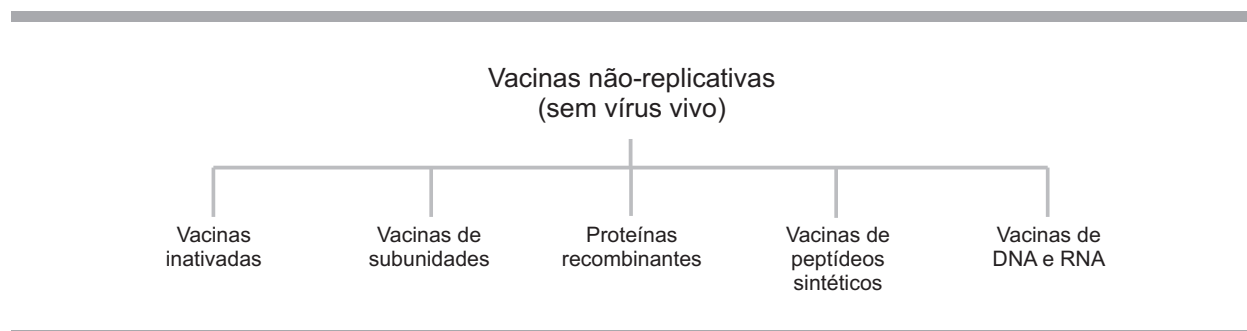


Figura 12.5. Tipos de vacinas que não contêm o vírus replicativo.

fócitos Tc. Após a administração de uma vacina inativada, ocorre a estimulação de clones específicos de linfócitos B, parte dos quais se transformam em plasmócitos secretores de anticorpos e parte se transformam em células de memória, de longa duração. Clones de linfócitos Th são também estimulados e auxiliam a proliferação e diferenciação dos linfócitos B por meio da secreção de citocinas (interleucinas). Em uma exposição posterior ao mesmo agente, as células de memória são rapidamente estimuladas e se diferenciam em plasmócitos. Os plasmócitos secretam grandes quantidades de anticorpos, muitos dos quais com atividade neutralizante, que são responsáveis pelo combate ao agente e controle da infecção.

Atualmente a maioria das vacinas virais utilizadas em medicina veterinária são inativadas. O controle e a erradicação da febre aftosa, no Brasil, são baseados na política de vacinação com uma vacina inativada. A vacina contra a raiva, que é utilizada em diferentes espécies, também é obtida pela amplificação do vírus em células de cultivo e posterior inativação. Várias vacinas inativadas estão atualmente em uso para proteger animais de viroses.

Ainda que sejam seguras e estáveis à temperatura ambiente, a magnitude e a duração da imunidade resultante do uso dessas vacinas são relativamente menores do que as produzidas pelas vacinas atenuadas. A incapacidade de replicação do vírus determina a necessidade de realizar reforços vacinais, além de se incluir grande quantidade de antígeno na vacina, o que pode elevar o seu custo. Apesar dessas estratégias, os resultados são geralmente inferiores aos obtidos com vacinas vivas. Além disso, as vacinas inativadas requerem o uso de potencializadores da resposta imunológica – denominados adjuvantes – que também aumentam o seu custo e provocam efeitos colaterais. Não obstante, as vacinas inativadas continuam sendo a única opção contra algumas doenças, seja pela impossibilidade de se obter suficiente atenuação do agente ou pela impossibilidade de se usar o vírus replicativo em algumas situações, como em fêmeas prenhes ou em áreas livres.

4.2.2 Vacinas de subunidades virais

O sistema imunológico – por meio de suas células e moléculas – não reconhece a estrutura completa do vírus. Ao contrário, reconhece e interage com pequenas regiões das proteínas que compõem as partículas víricas. Essas regiões, que na realidade são determinadas seqüências de aminoácidos, são denominadas epitopos ou determinantes antigênicos. Dentre os epitopos que um vírion possui, alguns são mais imunogênicos do que outros. Além disso, a maioria dos epitopos virais não gera imunidade protetora, capaz de neutralizar os vírions ou provocar a lise das células infectadas. No entanto, existem proteínas e epitopos altamente imunogênicos, contra os quais a resposta imunológica é altamente efetiva. Dessa forma, é possível produzir vacinas com frações ou proteínas do vírus, selecionadas dentre as mais imunoprotetoras. Para isso, o vírus deve ser inicialmente cultivado e produzido em grande quantidade. A seguir, uma ou mais dessas proteínas virais são purificadas por métodos químicos e administradas junto com adjuvantes na forma de vacina (Figura 12.6). Por conterem apenas frações do vírus, essas vacinas são denominadas vacinas de subunidade. Portanto, as vacinas de subunidade contêm apenas porções ou proteínas do vírus, e não o vírus completo, sendo desprovidas de capacidade replicativa e são muito seguras.

Essa metodologia tem sido utilizada para a produção de vacinas contra a influenza humana. Para tal, diferentes cepas do vírus são cultivadas em ovos embrionados de galinhas seguido de inativação e subsequente purificação das hemaglutininas virais que irão constituir a vacina. Uma outra opção disponível é a vacina contendo as glicoproteínas da superfície do vírus (hemaglutinina), que são reunidas e administradas na mesma vacina. A vacina clássica contra o vírus da hepatite B humana (HBV) era produzida pela purificação de partículas subvirais inertes, obtidas do plasma de indivíduos portadores. Contudo, apesar dos diversos trabalhos de pesquisa descritos, ainda não há opções de vacinas de subunidades disponíveis no comércio para vírus de interesse veterinário.

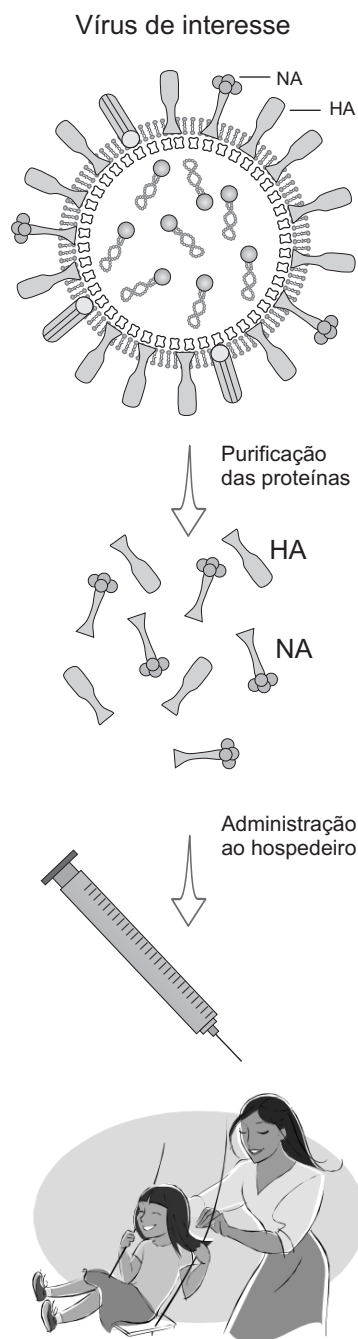


Figura 12.6. Princípio das vacinas de subunidades virais. O vírus de interesse é amplificado até atingir altos títulos. As proteínas de interesse são, então, purificadas por métodos químicos e utilizadas para imunizar os hospedeiros. O exemplo se refere às vacinas de subunidades contra o vírus da influenza humana, que contém frações purificadas das glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA).

4.2.3 Vacinas de proteínas recombinantes

A base dessas vacinas é semelhante às anteriores, com a diferença que a proteína viral de interesse não é extraída dos vírions, e sim produzida em organismos recombinantes. O gene de interesse é removido do vírus e inserido no genoma de bactérias ou leveduras, que passam a produzir a proteína em grande quantidade, possibilitando a sua purificação e administração na forma de vacina (Figura 12.7). Este sistema, além de produzir uma maior quantidade da proteína imunoprotetora, é também seguro e de baixo custo. A vacina atual contra a HBV, licenciada e disponível para a imunização humana, foi produzida a partir da clonagem de genes que codificam o antígeno de superfície do HBV (HBsAg) em levedura. Os antígenos produzidos pelas leveduras recombinantes são subsequentemente purificados e utilizados como vacina. A administração dessa proteína ao hospedeiro estimula o desenvolvimento de resposta imunológica específica contra o vírus.

Utilizando o sistema de bactérias ou leveduras, genes que codificam capsídeos virais também podem ser clonados em plasmídeos e produzidos em grande escala. As proteínas produzidas se organizam em uma estrutura semelhante ao vírus original, porém vazio (*virus-like particles*), e podem ser utilizadas como vacina. Como essas partículas virais não possuem ácidos nucleicos e capacidade de replicação, são desprovidas de infectividade e totalmente seguras. Embora essas partículas já tenham sido produzidas experimentalmente para várias espécies de rotavírus, calicivírus, picornavírus e orbivírus, ainda não estão licenciadas no mercado veterinário. Alternativamente, vírus de plantas, como o vírus do mosaico-tabaco, podem servir como vetores de antígenos vacinais, que são administrados a plantas transgênicas que produzem o antígeno. Vacinas que utilizam esta estratégia de plantas transgênicas já foram desenvolvidas contendo genes do FMDV e do BoHV-1. Recentemente, foi produzida e está disponível no comércio uma vacina recombinan-

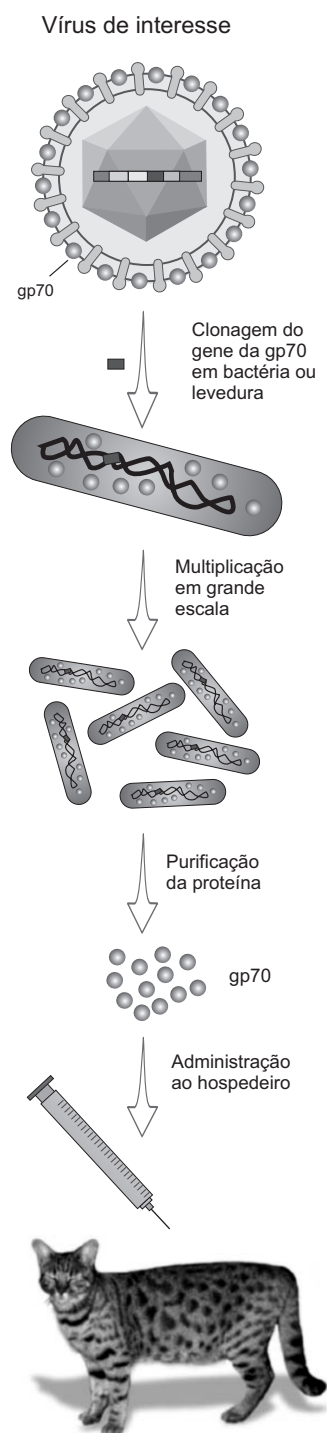


Figura 12.7. Princípio das vacinas de proteínas recombinantes. O gene que codifica uma proteína estrutural imunogênica do vírus é inserido no genoma de bactérias ou leveduras, que passam a expressar a proteína. Esses organismos são cultivados em grande escala e a proteína de interesse é purificada e utilizada para imunizar os animais. O exemplo se refere à vacina de proteína recombinante contra o FeLV, em que a glicoproteína gp70 é produzida em um sistema heterólogo e utilizada como vacina.

te contra o papilomavírus humano (HPV), agente associado com carcinoma de colo uterino em mulheres. A proteína do capsídeo do HPV é produzida em levedura, e as suas unidades se associam formando estruturas semelhantes aos vírions (*virus like particles*, VLPs). Essas partículas são, então, utilizadas como imunógeno e induzem boa proteção contra a infecção. Uma vacina contra o vírus da leucemia felina (FeLV) foi produzida pela expressão da glicoproteína viral gp70 em *E. coli* (Figura 12.7).

Vacinas que utilizam proteínas purificadas estimulam linfócitos Th CD4+, além de resposta humoral mediada por linfócitos B e anticorpos, contudo, não geram uma resposta relevante de linfócitos Tc. A ausência de resposta citotóxica deve-se ao fato de essas proteínas serem processadas e apresentadas quase exclusivamente associadas ao complexo de maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. Como resultado, não há a adequada estimulação e resposta mediada por linfócitos Tc, que dependem de estimulação via MHC-I. Vacinas contendo proteínas recombinantes apresentam perspectivas promissoras para uso em várias doenças víricas animais e humanas.

4.2.4 Vacinas de peptídeos sintéticos

Por maior que seja a molécula do antígeno, somente alguns epitopos são importantes para o reconhecimento pelos linfócitos B e indução da resposta imunológica. Assim, os epitopos virais, que são bem conhecidos e caracterizados por apresentarem maior capacidade imunoprotetora, podem ser sintetizados em laboratório, resultando em uma vacina de peptídeos sintéticos. Ou seja, essas vacinas contêm apenas as seqüências de aminoácidos correspondentes aos epitopos relevantes, produzidas sinteticamente em laboratório.

Os peptídeos produzidos são quimicamente análogos aos determinantes antigênicos originais e, em geral, contêm de 3 a 10 aminoácidos. Por meio desta metodologia, foi possível estimular a produção de anticorpos neutralizantes contra RabV, FMDV e parvovírus canino.

Os linfócitos B reconhecem antígenos na sua conformação natural. Assim, muitos dos epítopos capazes de estimular resposta humoral necessitam manter esta conformação. No entanto, grande parte dos peptídeos que são sintetizados apresenta-se como cadeias curtas de forma linear, não dispondo de conformação terciária ou quaternária. Como consequência, o nível de indução dos linfócitos B e a atividade dos anticorpos que é induzida pelas vacinas de peptídeos sintéticos são baixos e insatisfatórios quando comparados com aqueles induzidos pelas vacinas compostas por partículas virais completas ou por proteínas purificadas. Uma das estratégias usadas para contornar esta baixa imunogenicidade é a ligação dos peptídeos a proteínas maiores para induzir uma melhor resposta e produção de anticorpos.

4.3 Vacinas de DNA e RNA

No início dos anos 1990, foi demonstrado que a administração intramuscular de um DNA plasmídeo contendo um gene sob a regulação de um promotor de eucariotas era capaz de levar à expressão da proteína codificada pelo gene nas células do animal inoculado. Dessa forma, foram criadas as vacinas de DNA, que consistem de DNA exógeno contendo o gene da proteína de interesse sob regulação de um promotor. A inoculação desse DNA em animais resulta na produção da proteína viral nos tecidos do hospedeiro, o que desencadeia uma resposta imunológica contra ela. A natureza da resposta desencadeada é altamente desejável: além de resposta humoral, essa estratégia permite a estimulação de linfócitos Tc, que são importantes na resposta contra vírus.

A elaboração de uma vacina de DNA necessita a identificação prévia de um gene que codifica uma determinada proteína imunodominante e indutora de resposta protetora, o qual é inserido em um plasmídeo de expressão. Esse plasmídeo, que serve como vetor vacinal, contém um promotor eucariótico forte e um marcador de seleção para a produção do DNA em grande escala em bactérias. Uma grande quantidade desses plasmídeos é produzida em *E. coli*, sendo, então, purificada e inoculada no hospedeiro. Uma vez

no organismo hospedeiro, o DNA é transportado até o núcleo das células locais, onde o gene será transcrito, a proteína produzida e, posteriormente, apresentada ao sistema imunológico. O resultado é a estimulação de resposta imunológica humoral e celular contra esta proteína e, como consequência, contra o vírus que a possui em sua estrutura.

As vias de administração mais utilizadas para as vacinas de DNA são a intramuscular e a intradérmica, através das quais os plasmídeos podem ser injetados associados a lipídeos catiônicos ou através da metodologia de balística (*gene-gun*).

Nos experimentos realizados até o presente, os níveis de anticorpos detectados após a vacinação ainda são baixos. De fato, para induzir uma resposta imunológica satisfatória, é necessária a inoculação de uma grande quantidade de DNA. Por isso, a administração das vacinas através de *gene-gun* tem se mostrado mais eficiente frente às demais vias, já que possibilita administrar grandes quantidades de DNA, capazes de gerar resposta imune de maior magnitude. Porém, as dificuldades práticas da adoção desse método para aplicação da vacina tornam remota a sua adoção na área veterinária.

Embora o mecanismo de ação das vacinas de DNA seja aparentemente simples, pouco ainda é conhecido sobre a maneira exata pela qual desencadeiam a resposta imunológica. Sabe-se que a produção dos antígenos imunogênicos ocorre intracelularmente no organismo hospedeiro, portanto, não existem os riscos observados nas vacinas vivas, tais como infecção, produção de latência e desenvolvimento de imunidade contra o vetor vacinal. Os peptídeos resultantes são reconhecidos como não-próprios, sendo, então, processados por células apresentadoras de antígenos e expostos às células do sistema imune, via MHC classe I e II, resultando na indução de resposta de linfócitos Tc e Th, respectivamente. A resposta de linfócitos Tc é uma das principais vantagens das vacinas de DNA em relação aos outros tipos de vacinas não-replicativas, que somente estimulam linfócitos Th. Diversos estudos indicam que a resposta humoral e celular resultante é bastante satisfatória e, experimentalmente, não foram detec-

tadas interferências com a imunidade passiva.

Uma variação das vacinas de DNA são as vacinas de RNA. Nesses casos, o RNA mensageiro (mRNA) que codifica proteínas virais de interesse é produzido *in vitro* e incorporado em lipossomos ou em micropartículas. A inoculação dessas partículas ou lipossomos no animal resulta em transporte do mRNA para o interior das células, onde ocorre a tradução e produção da proteína. Esta proteína é, então, apresentada ao sistema imunológico, resultando em estimulação de resposta humoral e celular.

Embora as vantagens e aplicações originalmente vislumbradas, as vacinas de DNA e RNA ainda não encontraram a aplicação inicialmente prevista. Atualmente, apenas uma vacina de DNA encontra-se disponível para uso veterinário. Esta vacina – disponível nos EUA – é direcionada para proteger eqüinos contra o vírus do Nilo Ocidental (WNV), infecção emergente nas Américas.

4.4 Vacinas monovalentes e polivalentes

Várias vacinas de uso humano e animal contêm antígenos de mais de um vírus – e também de bactérias – em sua formulação. O objetivo de se formular vacinas di-, tri-, tetra- ou polivalentes é o de facilitar o manejo da vacinação, ou seja, imunizar os animais contra vários patógenos em apenas uma ocasião. Dentre as vacinas multivalentes, podem-se mencionar dois tipos, de acordo com o objetivo e abrangência: a) vacinas multivalentes direcionadas contra síndromes clínicas definidas; b) vacinas multivalentes direcionadas contra vírus não-relacionados, mas que são prevalentes na população. Dentre as primeiras, incluem-se as vacinas contra os vírus que compõem o complexo respiratório bovino (BoHV-1, BVDV, vírus da parainfluenza 3 e BRSV), que frequentemente estão associados na etiologia dessa patologia. Nessa categoria também se incluem as vacinas contra diarreias neonatais de bovinos e suínos, que possuem rotavírus e coronavírus em sua formulação, além de antígenos bacterianos. Dentre as vacinas multivalentes contra vírus não-relacionados, incluem-se as vacinas contra viro-

ses de cães, que contêm antígenos de até cinco vírus diferentes em sua formulação, além de antígenos bacterianos. Estas apresentam como objetivo imunizar os animais contra os agentes mais prevalentes da espécie, mesmo que alguns não apresentem relação epidemiológica entre si. São disponíveis comercialmente também vacinas di- e trivalentes, contra vírus de maior importância em determinadas situações epidemiológicas.

A maior vantagem das vacinas multivalentes é a praticidade, pois permitem a imunização dos animais contra vários agentes na mesma aplicação. Essas vacinas, no entanto, apresentam algumas restrições potenciais do ponto de vista imunológico: a) exigem a resposta simultânea do sistema imunológico contra um número muito grande de antígenos; b) mesclam antígenos imunodominantes com antígenos menos dominantes; c) incluem agentes imunossupressores em algumas delas; d) unificam a ocasião da aplicação, que pode não ser ótima para vários dos antígenos presentes; e) algumas mesclam vírus vivo com vírus inativado. Mesmo assim, várias vacinas de uso animal contêm antígenos de mais de um vírus em sua formulação e muitas delas têm sido usadas com sucesso para o fim a que se destinam.

As vacinas replicativas e não-replicativas apresentam propriedades e restrições, de acordo com a sua formulação e finalidade a que se destinam. As principais vantagens e desvantagens desses dois tipos de vacina estão apresentadas na Tabela 12.2.

5 Adjuvantes

Os adjuvantes são substâncias que têm a função de potencializar a resposta imunológica induzida por vacinas não-replicativas, constituídas por vírus inativados, subunidades ou proteínas recombinantes. As proteínas na forma solúvel e os antígenos purificados e de baixo peso molecular que compõem essas vacinas podem ser pouco imunogênicos, mas apresentam um aumento acentuado na sua imunogenicidade quando são combinadas com adjuvantes. Por isso, com exceção das vacinas atenuadas (compostas de vírus vivo) e das vacinas de DNA e RNA, as outras for-

Tabela 12.2. Propriedades e restrições das vacinas víricas replicativas (vivas) e não-replicativas (não-vivas)

Característica	Replicativas	Nã-replicativas
Imunidade mediada por linfócitos TcD8+	Sim	Não
Duração da imunidade	Longa	Curta
Necessidade de adjuvante	Não	Sim
Quantidade de antígeno por dose	Pequena	Grande
Número de doses	Uma (geralmente)	Várias
Via de administração	Injetável ou oral	Injetável
Estabilidade térmica	Lábil	Estável
Reversão à forma virulenta	Raro	Não
Uso em fêmeas em gestação	Não recomendado	Sim

mas de vacinas não-vivas devem, necessariamente, incluir adjuvantes em sua formulação.

Além de aumentar a magnitude da resposta imune, alguns adjuvantes são capazes de promover a indução da imunidade de mucosas e estimular linfócitos Tc, aumentando a eficiência de macrófagos e células dendríticas na apresentação de antígenos e prolongando a expressão do complexo peptídeo/MHC-II na superfície de células

apresentadoras de antígenos. Por outro lado, a maioria dos adjuvantes não é capaz de formar ligações estáveis com o antígeno.

Diversas substâncias têm sido utilizadas como adjuvantes, diferindo na sua composição, que geralmente determina o modo de ação (Tabela 12.3). Em geral, existem dois mecanismos principais de atuação: sistemas de entrega do antígeno e adjuvantes imunoestimuladores.

Tabela 12.3. Principais adjuvantes utilizados em vacinas de uso veterinário e seu mecanismo de ação

Tipo de adjuvante	Forma de ação	Exemplos
Sais inorgânicos	Armazenamento e liberação gradual do antígeno.	Hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, fosfato de cálcio.
Componentes de bactérias	Armazenamento e liberação gradual do antígeno, estimulação de macrófagos	Adjuvante completo de Freund.
	Estimulação de macrófagos e indução da liberação de citocinas.	LPS, BCG (linhagem atenuada de <i>Micobacterium bovis</i>).
Partículas lipídicas	Armazenamento e liberação gradual do antígeno.	Adjuvante incompleto de Freund (emulsão de óleo em água).
	Liberação do antígeno encapsulado no citosol, estimulando linfócitos T citotóxicos.	Lipossomos, virossomos, ISCOMs.
Citocinas	Estímulo de células T citotóxicas ou de células dendríticas.	Interleucinas 1, 2 e 12; Interferon alfa e gama.

Sais inorgânicos, como o hidróxido de alumínio, promovem a precipitação e a deposição do antígeno no local da aplicação da vacina, de onde será liberado gradualmente. A liberação lenta do antígeno é também o princípio de ação das emulsões de água em óleo, como o adjuvante incompleto de Freund, que forma depósitos no tecido inoculado.

Frações de origem bacteriana podem ser ótimos adjuvantes. Os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos desencadeiam sinais que tornam as células apresentadoras de antígeno mais ativas. Esses compostos induzem ainda a produção de citocinas inflamatórias e, conseqüentemente, a resposta imunológica local é de magnitude superior. O adjuvante completo de Freund contém, além do óleo mineral, micobactérias inativadas, cujos componentes da parede celular são capazes de aumentar a imunoestimulação.

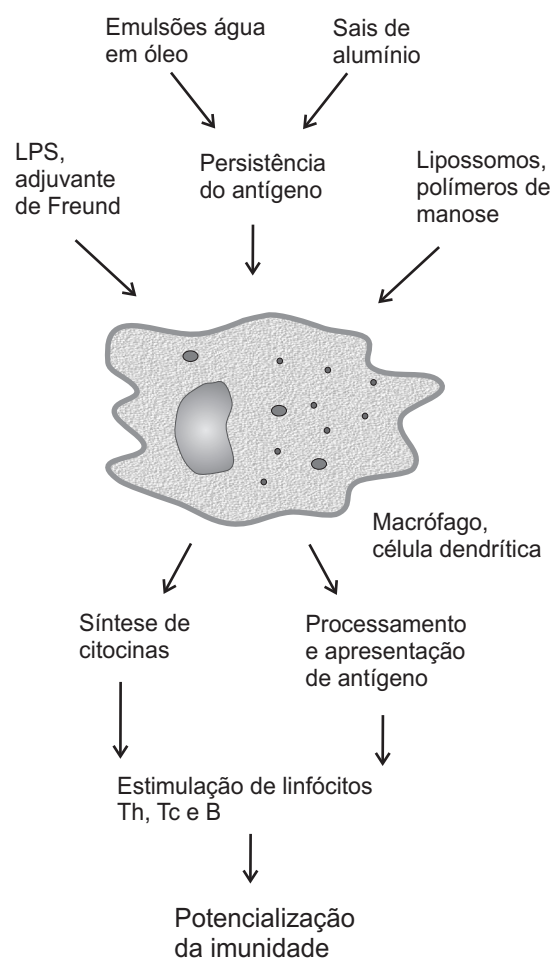
Vesículas artificialmente produzidas a partir de lipídeos, denominadas lipossomos, podem incorporar antígenos no seu interior ou superfície. Se os lipossomos forem envoltos por proteínas do envelope viral, serão capazes de mimetizar o envelope natural do vírus, sendo chamados de virossomos. Vacinas contra a influenza e vírus da hepatite A humana, baseadas em virossomos, já foram licenciadas em vários países europeus.

Complexos imunoestimuladores (ISCOMs) resultam da mistura do antígeno ao colesterol, fosfolipídeos e à saponina Quil A, um glicosídeo purificado de plantas. Os ISCOMs apresentam estrutura esférica, com cerca de 40 nm de diâmetro, e já existem algumas vacinas para uso veterinário que utilizam este complexo como adjuvante. Outra possibilidade que surgiu através da tecnologia de DNA recombinante foi a fusão de proteínas ou peptídeos imunoprotetores de vírus com diferentes citocinas. Esses complexos agiriam como adjuvantes e direcionariam a resposta imune desejada.

As células apresentadoras de antígenos, particularmente as células dendríticas e os macrófagos, são os principais alvos da ação dos adjuvantes, resultando em efeitos diversos que produzem um aumento na resposta imune (Figura 12.8).

Alguns efeitos adversos decorrentes do uso de adjuvantes devem ser considerados. Os sais inorgânicos geralmente desencadeiam reação granulomatosa no local da aplicação. O adjuvante

completo de Freund não é utilizado em animais de produção, devido à possibilidade de induzir reação cruzada com o teste de tuberculinização e à intensa reação local. As reações adversas locais, bem como a possibilidade de desenvolver efeitos carcinogênicos, fazem com que este tipo de adjuvante também não seja utilizado em vacinas humanas.



Fonte: adaptado de Tizard (2001).

Figura 12.8. Mecanismos de potencialização da resposta imunológica, desencadeados pelos principais adjuvantes utilizados em vacinas de uso veterinário.

Somente compostos contendo alumínio, hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio estão atualmente aprovados para uso humano. Já na área veterinária, as substâncias mais utilizadas como adjuvantes são o óleo mineral e os sais minerais baseados em alumínio, embora outros compostos estejam sendo testados experimentalmente. A principal dificuldade em identificar

novos adjuvantes é que, embora muitos resultados experimentais em animais demonstrem boa capacidade imunoestimuladora, esses compostos freqüentemente são tóxicos para os animais.

6 Controle de qualidade

Durante o processo de desenvolvimento e produção, as vacinas devem ser submetidas a testes para assegurar a sua inocuidade e capacidade imunogênica. Dentre os testes realizados incluem-se os de esterilidade (para assegurar a ausência de contaminação bacteriana ou fúngica), inocuidade (para certificar que não causa efeitos indesejáveis), estabilidade (para verificar a estabilidade genética e fenotípica dos vírus atenuados; ou para atestar a estabilidade do antígeno, no caso de vacinas inativadas) e potência (capacidade imunogênica).

Dentre esses testes, os de potência assumem uma importância especial, pois avaliam a capacidade da vacina de induzir uma resposta imunológica adequada. Em geral, esses testes são realizados na espécie animal para qual a vacina é destinada. No entanto, animais de laboratório (cobaias, coelhos) podem também ser utilizados, desde que se avalie previamente a resposta imunológica dessas espécies e se compare esta com a resposta do hospedeiro natural. A capacidade imunogênica de uma vacina pode ser avaliada pela detecção e quantificação dos anticorpos produzidos em resposta à imunização ou por testes de desafio.

A quantificação da resposta sorológica induzida é o método mais utilizado para se avaliar o potencial imunogênico de antígenos vacinais. Para isso, um grupo de animais é vacinado e anticorpos específicos contra o vírus são pesquisados por técnicas sorológicas como soroneutralização (SN) ou ELISA, a diferentes intervalos após a vacinação. Além da quantificação da resposta sorológica a curto prazo (30, 60 dias), pode-se acompanhar os animais por um período mais longo, a fim de monitorar-se a duração da resposta induzida. A maior restrição desse método refere-se ao fato de que quantifica apenas a resposta humoral. Portanto, é mais apropriado para a avaliação de vacinas não-replicativas, que induzem resposta predominantemente humoral. Para alguns vírus,

os títulos de anticorpos que conferem proteção já foram razoavelmente determinados. Assim, a detecção de anticorpos com títulos desta magnitude nos animais vacinados pode ser utilizada como indicativo de proteção e da eficácia da vacina. Para vacinas replicativas, no entanto, o parâmetro sorológico nem sempre reflete a magnitude da resposta imunológica, pois não avalia a resposta celular. Embora também utilizado para avaliar a potência de vacinas replicativas, a sorologia deve ser considerada um indicador apenas parcial da imunogenicidade, pois essas vacinas induzem também resposta mediada por linfócitos Tc.

O método mais objetivo de se avaliar a eficácia de uma vacina é a vacinação seguida de desafio. Nesse teste, um grupo de animais é vacinado de acordo com as recomendações do fabricante, e outro grupo permanece não-vacinado (controle). Após algum tempo (geralmente 30-60 dias), os animais dos dois grupos são inoculados com o vírus patogênico pela via natural de infecção. Essa inoculação é denominada desafio e objetiva mimetizar uma situação de infecção natural que os animais podem, eventualmente, enfrentar a campo. Após o desafio, os animais vacinados e os controles são monitorados quanto à excreção viral e, principalmente, quanto à manifestação de sinais clínicos de doença. A eficácia da vacina é medida por sua capacidade de reduzir a excreção viral (magnitude e duração) e, sobretudo, por prevenir a ocorrência de doença nos animais vacinados. Se a vacina objetiva prevenir a infecção fetal e a ocorrência de abortos, por exemplo, fêmeas prenhes previamente vacinadas devem ser desafiadas, e o efeito da infecção nos fetos deve ser monitorado. Embora seja o método mais objetivo de avaliação de eficácia vacinal, este método apresenta algumas dificuldades, tais como: custo elevado, dificuldade crescente do uso de animais para experimentação, incerteza quanto à cepa e dose viral a ser utilizada no desafio, entre outras.

7 Conservação e administração de vacinas

As vacinas podem ser administradas por diferentes vias, que são definidas pelas características do antígeno ou do vírus vacinal, do tipo

de imunidade que se deseja estimular, da doença contra a qual se destinam e também da espécie animal na qual são aplicadas. As principais vias de administração de vacinas víricas são: intramuscular, subcutânea, intradérmica, cutânea, ocular, oral e nasal. A maioria das vacinas animais é administrada por via parenteral (intramuscular ou subcutânea); algumas são administradas por via oral (na água de bebida ou ração) ou por meio de aerossóis; e poucas são administradas através de escarificações na pele. Vacinas de aplicação intraprepucial e intravaginal também já foram desenvolvidas para a doença genital causada pelo BoHV-1. A vacina contra o ectima contagioso de ovinos é aplicada em gotas, após escarificação da pele da face interna da coxa. A vacinação em massa é a forma mais adequada para a imunização de animais de produção, como suínos e aves, e pode ser realizada por meio da água de beber e por aerossol.

A via pela qual a vacina é administrada influencia o tipo de imunoglobulina que é produzida, sendo um fator de grande importância na prevenção da infecção, pois o estímulo da imunidade deve ocorrer preferencialmente nos locais de penetração do vírus no organismo. Como exemplo, as vacinas de vírus atenuados que são administradas pelas vias nasal e oral devem replicar no trato respiratório e intestinal, respectivamente.

Nas infecções de mucosas, como a respiratória, intestinal, genital, urinária e ocular, a IgA secretada nessas mucosas é a imunoglobulina mais importante para a prevenção da infecção. Portanto, há situações em que a imunidade local é mais importante do que a imunidade sistêmica, o que influencia diretamente na via de administração da vacina. Vacinas atenuadas, administradas pela via oral contra o NDV das aves, têm a vantagem de favorecer a replicação viral no trato intestinal, promovendo o estímulo e síntese de IgA local por um período prolongado. O vírus da poliomielite humana replica no epitélio intestinal, que é o mesmo sítio de replicação da vacina atenuada de uso oral, conhecida como Sabin. A imunidade resultante é, portanto, vantajosa em relação à administração injetável da vacina. Vacinas inativadas contra a influenza, que são

administradas na forma parenteral, podem não estimular a resposta de IgA na mucosa respiratória, sítio no qual a imunidade é mais importante frente a uma subsequente exposição ao vírus.

Um importante avanço foi obtido na indústria avícola com a demonstração de que embriões de galinha podem ser vacinados ainda dentro do ovo e, assim, desenvolver precocemente uma resposta imunológica. A vacinação *in-ovo* estimula a imunidade dos pintos antes dos primeiros dias de vida, momento em que, provavelmente, terão o primeiro contato com o vírus de campo. Nesse caso, os ovos são vacinados entre os 17 e 18 dias de incubação, exatamente no momento em que é feita a transferência para os nascedouros. A vacinação *in-ovo* é realizada de modo automatizado, através de um equipamento capaz de imunizar até 50.000 ovos a cada hora. Atualmente, essa via de vacinação está disponível apenas para a doença de Marek, mas há perspectiva de se estender o método para outros patógenos importantes de aves.

A correta conservação desempenha um papel muito importante na eficácia das vacinas. As vacinas com vírus replicativo apresentam menor estabilidade, pois o vírus pode perder a sua viabilidade sob condições inadequadas de temperatura e exposição à radiação solar. As vacinas não-replicativas são geralmente mais estáveis, porém também necessitam ser adequadamente conservadas para evitar a degradação dos antígenos e redução da sua potência. Como regra, recomenda-se conservar as vacinas não-vivas a 4-6°C, evitando-se o congelamento e descongelamento. A maioria das vacinas víricas vivas é comercializada de forma liofilizada e deve ser conservada sob congelamento (-20°C). Estas vacinas devem ser ressuspensas imediatamente antes do uso, para evitar a perda da viabilidade do vírus vacinal. Recomenda-se a sua aplicação no menor intervalo de tempo possível após a ressuspensão. Se necessário, podem ser mantidas resfriadas por algumas horas, evitando-se o congelamento e descongelamento. Exposição a desinfetantes, água clorada, irradiação solar e altas temperaturas são altamente prejudiciais à viabilidade dos vírus e possuem efeitos altamente deletérios sobre a eficácia vacinal.

8 Falhas vacinais

As vacinas víricas são utilizadas para conferir proteção contra exposições posteriores ao agente, impedindo que as infecções resultem em doença clínica. Se a resposta imunológica decorrente da vacinação for de amplitude e magnitude adequadas, deverá minimizar a replicação e a disseminação do vírus no organismo e prevenir a ocorrência de manifestações clínicas. No entanto, algumas vezes, não se obtém o efeito protetor esperado, por razões diversas. Em geral, as falhas vacinais podem ser atribuídas a problemas intrínsecos da vacina, de sua conservação ou administração, ou também a falhas do animal em responder à vacinação (Figura 12.9).

Várias famílias de vírus, principalmente as de genoma RNA, possuem sorotipos ou variantes antigênicos que possuem distribuição variada na população. Dessa forma, pode ser importante tipificar a cepa de campo de algumas espécies de vírus antes de se recomendar a vacina mais apropriada para uma determinada região. Um exemplo disto tem sido o IBV, contra o qual estão disponíveis várias cepas vacinais diferentes. Os isolados têm sido caracterizados por SN ou PCR, seguido de seqüenciamento ou clivagem do genoma com enzimas de restrição. O resultado da caracterização é comparado com a das cepas vacinais e pode-se optar pela cepa que mais se assemelhe ao vírus de campo. Outro exemplo tem sido a vacina autógena utilizada para o controle do PCV, já que isolados de outras regiões ou empresas produtoras conferem uma proteção

menos eficiente. O mesmo ocorre com o BVDV, cujas vacinas disponíveis no comércio brasileiro contêm isolados norte-americanos, que são antígenicamente diferentes dos isolados locais. Infelizmente, para muitas espécies de vírus, ainda existe pouca informação sobre as características genômicas e antigênicas das cepas que circulam na população animal local.

Alguns métodos utilizados para a produção de vacinas podem resultar em antígenos que são menos eficientes na ativação do sistema imunológico se comparados com o vírus original. De fato, a destruição parcial ou completa dos epítopos imunoprotetores, que pode ocorrer durante o processamento e inativação do vírus vacinal, é capaz de reduzir a sua capacidade imunogênica. Ainda que o antígeno inativado permaneça estável, se estiver presente em quantidade insuficiente, poderá resultar no comprometimento da eficácia vacinal. Em grande parte, esses efeitos podem ser minimizados com base nos testes de qualidade a que as vacinas comerciais devem ser submetidas. Esses testes devem incluir necessariamente provas de potência vacinal, nos quais é avaliada a capacidade imunogênica da vacina produzida.

Muitas vezes, as causas de falhas vacinais estão relacionadas ao animal e decorrem da vacinação em período impróprio. Uma das causas mais freqüentes da falta de resposta vacinal é a vacinação dos animais no período de incubação da doença, quando a vacina não será efetiva. O momento de vacinar também deveria ser considerado na decisão de vacinar animais jovens.

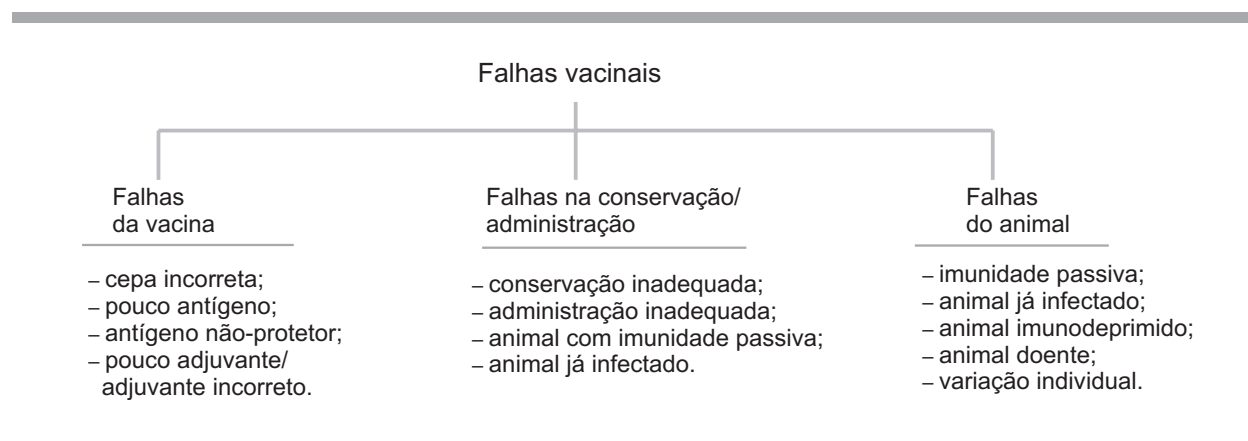


Figura 12.9. Principais causas de falhas vacinais.

Se realizada no momento em que os animais ainda estão protegidos pela imunidade passiva, a vacinação será parcialmente efetiva devido à interferência dos anticorpos maternos. De fato, a presença de imunidade passiva provavelmente se constitui em uma das causas mais comuns de falhas vacinais. A resposta à vacina pode ser prejudicada ainda por condições desfavoráveis do animal vacinado, principalmente situações de estresse, presença de doenças imunodepressoras, subnutrição ou intensa infestação por parasitas.

Por todos os aspectos que influenciam a imunidade que decorre da vacinação, sabe-se que a resposta imunológica não será de magnitude igual em todos os indivíduos vacinados. Ou seja, cada animal responderá de maneira individual. Assim, a maioria dos animais montará uma resposta moderada ou média; e alguns animais responderão de forma excelente e outros de forma insatisfatória. Os animais que respondem de maneira insuficiente são epidemiologicamente importantes em doenças altamente contagiosas, como a febre aftosa, e representam uma possibilidade de disseminação da doença. Já em viroses pouco insidiosas e de evolução lenta, como a raiva, uma população vacinada que responde de forma parcial à vacina pode ser suficientemente capaz de impedir a disseminação da doença.

A eficácia das vacinas pode ser prejudicada pelo armazenamento inadequado, principalmente no caso de vacinas contendo vírus vivos mantidas sob temperaturas superiores à recomendada. Mesmo que armazenadas de modo correto, o título viral das vacinas vivas tende a reduzir devido à inativação de vírus ao longo do prazo de validade do produto. Por exemplo, as vacinas associadas a células que são utilizadas contra a doença de Marek sofrem acentuada redução do título viral durante o período de armazenamento a -20°C. Dessa forma, devem ser estocadas em nitrogênio líquido e, uma vez descongeladas, devem ser aplicadas em um curto período de tempo.

Por outro lado, a vacinação por métodos alternativos ao parenteral, como a via nasal, oral ou por aerossóis, pode dificultar não só a administração da dose vacinal correta, como também a imunização uniforme de todos os animais de um

lote. Para espécies criadas em grandes concentrações, como na avicultura industrial, a viabilidade de vacinas orais compostas de vírus sensíveis ao cloro pode ser comprometida com a excessiva cloração da água, que é utilizada como veículo vacinal. Finalmente, deve ser considerada a interferência de desinfetantes empregados excessivamente para a antissepsia que precede a administração parenteral de vacinas vivas.

Cabe ressaltar que a ocorrência de doença branda em animais vacinados não significa necessariamente uma falha vacinal. As vacinas são produzidas para proteger os animais da doença clínica. No entanto, algumas delas não conseguem cumprir integralmente este objetivo e, mesmo animais vacinados, podem desenvolver um quadro clínico discreto. Se esta vacina for efetiva na redução significativa da gravidade da doença, quando comparada com animais não-vacinados, pode-se afirmar que a mesma cumpriu parcialmente o seu objetivo.

9 Reações adversas da vacinação

Embora os benefícios obtidos pelo uso da vacinação sejam inquestionáveis, como a erradicação de várias doenças virais, nenhuma vacina é totalmente isenta de riscos. Apesar de relativamente raros, efeitos indesejáveis e prejudiciais à saúde do hospedeiro têm sido relatados pelo uso de vacinas. Por isso, a possibilidade de efeitos colaterais não deve ser negligenciada e os benefícios advindos da vacinação devem superar os riscos possíveis resultantes de seu uso.

Efeitos residuais de virulência em vacinas vivas devem ser considerados. Um sorotipo avirulento do poliovírus, utilizado na vacina oral infantil, pode sofrer mutações e tornar-se virulento, causando poliomielite pela administração da vacina numa taxa de um caso a cada milhão. Casos de encefalite pós-vacinal, atribuída ao vírus presente na vacina, já foram relatados em bovinos vacinados contra o BoHV-1 e em cães vacinados contra o CDV.

Vacinas vivas devem ser utilizadas com muito critério em animais imunodeprimidos. Por outro lado, a vacinação contra um agente pode causar imunodepressão, que pode ser de-

terminante na resposta à vacinação contra outros microorganismos. Vacinas atenuadas contra a parvovirose canina causam imunodepressão em filhotes, os quais podem adoecer após a aplicação de vacina viva contra a cinomose. Também o estresse causado pelo manejo dos animais durante a vacinação é uma causa comprovada de reativação das infecções latentes pelos herpesvírus.

A vacinação de fêmeas em gestação deve ser precedida de cuidados com relação à decisão de vacinar contra determinados vírus, assim como na escolha do tipo de vacina a ser utilizada. Vacinas com vírus atenuados administradas a fêmeas gestantes que não foram anteriormente imunizadas podem prejudicar o desenvolvimento fetal e mesmo causar abortos, como no caso do vírus da panleucopenia felina (FPLV), BoHV-1 e BVDV. Sendo assim, vacinas contendo vírus inativados são as mais indicadas para a vacinação das fêmeas nesse período.

Por outro lado, é possível que vacinas inativadas potencializem a doença decorrente de um contato posterior com o vírus de campo por parte do filhote vacinado. Esse fato já foi observado em crianças previamente vacinadas contra o vírus respiratório sincicial (RSV) e em potros vacinados contra o vírus da encefalite eqüina do leste (EEEV).

Reações de hipersensibilidade podem surgir após a administração de várias doses de vacina; principalmente tratando-se de vacinas inativadas ou de anti-soro. Essas reações podem variar de hipersensibilidade do tipo III, com intensa reação inflamatória local, até distúrbio vascular generalizado. Pacientes expostos ao RabV passavam pelo tratamento pós-exposição com o soro anti-rábico produzido em coelhos, que exigia múltiplas aplicações abdominais, as quais, muitas vezes, desencadeavam reações de hipersensibilidade. Reações de hipersensibilidade retardada, com formação de granulomas, podem ser ocasionadas pelo uso de determinados tipos de adjuvantes, como os que agem pela formação de depósitos. Por isso, esses tipos de adjuvantes não são utilizados na formulação de vacinas para uso humano e animal. Qualquer componente da vacina pode ser responsável pelo desencadeamento da reação, já

que a resposta de cada organismo é muito peculiar. Contudo, os mais envolvidos são os antígenos derivados dos cultivos de células ou de ovos embrionados utilizados para o cultivo do vírus. Pessoas ou animais alérgicos a albumina do ovo podem apresentar hipersensibilidade imediata e desenvolver choque anafilático em resposta a vacinas cujo vírus foi amplificado em ovos embrionados. Um efeito adverso menos deletério é a opacidade da córnea em cães decorrente da vacinação contra a hepatite viral canina com o adenovírus canino tipo 1 (CAdV-1). Este problema tem sido evitado pela utilização do CAdV-2 na formulação vacinal, em vez do CAdV-1.

O uso de vacinas pode favorecer a seleção de novas variantes antigênicas dos vírus. A imunização parcial do rebanho é apontada como uma das causas de pressão seletiva que favorece o surgimento de novas variantes do vírus, as quais podem substituir o vírus de campo. Em galinhas, tem sido bem evidente o surgimento periódico de novas variantes do IBV e do IBDV, apesar da massiva utilização de vacinas contra esses patógenos.

10 Drogas antivirais

A abordagem convencional para o controle das doenças virais tem sido o desenvolvimento de vacinas efetivas, o que não tem sido possível para um número considerável de agentes. Em virtude disso, uma ênfase muito grande tem sido dada para a busca de drogas antivirais, sobretudo em medicina humana. No entanto, o desenvolvimento de drogas antivirais é muito mais difícil do que o desenvolvimento de drogas antibacterianas, embora as perspectivas a longo prazo sejam encorajadoras. A dificuldade de se obter drogas antivirais aplicáveis a humanos e animais se deve principalmente ao fato de a replicação viral utilizar fundamentalmente o metabolismo das células hospedeiras para replicar. Desse modo, o equilíbrio para evitar a replicação viral e não causar toxicidade para a célula é muito sensível. Apesar disso, o conhecimento sobre a bioquímica da replicação viral tem aumentado sensivelmente e permitido o desenvolvimento de

drogas que são fundamentais para o tratamento de algumas viroses humanas (Tabela 12.4). Ainda não existem drogas licenciadas para uso veterinário, embora existam perspectivas de que isto possa ocorrer em breve.

Teoricamente, todas as enzimas e processos essenciais para a replicação viral são alvos potenciais para a terapia antiviral. Uma abordagem que tem sido utilizada para o desenvolvimento

de novas drogas é a síntese de substâncias que inibam essas etapas, como os inibidores da transcriptase, replicase e protease. Após, variações dessas drogas são sintetizadas e testadas para se obter um inibidor mais potente e menos tóxico.

Assim como ocorre nas drogas antibacterianas, a resistência às drogas antivirais também tem sido descrita. Por exemplo, existem dois tipos de drogas contra o vírus da influenza A: os inibido-

Tabela 12.4. Drogas antivirais disponíveis para o tratamento de infecções víricas humanas

Droga	Vírus	Tipo químico	Alvo
Vidarabina	herpesvírus	análogo de nucleosídeo	polimerase viral
Aciclovir	herpes simplex (HSV)	análogo de nucleosídeo	polimerase viral
Ganciclovir e valganciclovir	citomegalovírus	análogo de nucleosídeo	polimerase viral
Análogos de nucleosídeo inibidores da transcriptase reversa: Zidovudina (AZT), Didanosina (ddI), Zalcitabina (ddC), Stavudina (d4T), Lamivudina (3TC)	retrovírus (HIV)	análogo de nucleosídeo	transcriptase reversa
Não nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa: Nevirapina, Delavirdina	retrovírus (HIV)	análogo de nucleosídeo	transcriptase reversa
Inibidores da protease: Saquinavir, Ritonavir, Nelfinavir	HIV	análogo de peptídeo	protease do HIV
Ribavirina	amplo espectro: HSV, HCV, rubéola, sarampo	triazol carboxamida	mutágeno de RNA
Ribavirina	amplo espectro: HSV, HCV, rubéola, sarampo	triazol carboxamida	mutágeno de RNA
Amantadina, Rimantadina	vírus da influenza A	amina tricíclica	proteína da matriz, hemaglutinina
Relenza, Tamiflu	vírus da influenza A e B	mimético do ácido neurâmico	inibidor da neuraminidase
Meconaril	picornavírus	cíclico pequeno	vírions (bloqueia a ligação e desnudamento)
Interferons	vírus da hepatite B e C	proteína	ativa proteínas de defesa

res da neuraminidase e os derivados da adamantina (amantadina e rimantadina). Um estudo do *Centers for Disease Control* (CDC), nos EUA, em 2005, demonstrou que ambos os princípios ativos eram eficazes na redução da duração da sintomatologia clínica, contudo, não eram eficazes contra todas as cepas circulantes. De fato, algumas cepas possuíam resistência contra mais de uma dessas drogas. Outra desvantagem que as drogas antivirais apresentam é a de que são efetivas na fase mais intensa de replicação viral. No entanto, quando os sinais clínicos são mais aparentes – e por isto atraem o interesse do médico ou veterinário – grande parte da replicação viral responsável pelas patologias observadas já ocorreu.

O interesse pelo desenvolvimento de drogas antivirais foi renovado após o surgimento de vírus para os quais a obtenção de vacinas efetivas parece ser muito difícil, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da hepatite C (HCV), entre outros. O desenvolvimento de drogas antivirais para vírus de interesse humano certamente trará consigo importantes avanços para a obtenção de drogas aplicáveis também em viroses animais.

11 Vacinas víricas licenciadas no Brasil

O Brasil é um dos principais produtores pecuários e está entre os principais países exporta-

dores de carne bovina, suína e de frango. Paralelamente, no âmbito interno, foi possível observar, nas últimas décadas, o aumento expressivo do interesse por animais de companhia, estimulando o desenvolvimento de um mercado bastante específico de produtos alimentares e de medicamentos.

Nesse sentido, as vacinas desempenham um papel fundamental no controle e erradicação de várias doenças virais humanas e animais. No mercado veterinário de vacinas, os animais de produção apresentam a maior parcela no faturamento (88,1%), enquanto os animais de companhia já respondem por 9,3%. Somados todos os tipos de vacinas contra patógenos de animais, no ano de 2004, esse tipo de produto foi o que apresentou o maior faturamento (31,5%) no mercado de produtos veterinários no Brasil. Atualmente, são licenciadas 433 diferentes vacinas para a linha veterinária, sendo que nem todas estão no mercado. Na Tabela 12.5, encontram-se listadas as vacinas víricas licenciadas no país.

Diante da perspectiva futura de desenvolvimento e licenciamento de novas vacinas baseadas na metodologia de DNA recombinante, muito provavelmente algumas das vacinas atuais poderão ser, gradativamente, substituídas por opções mais seguras e eficientes para proteger os animais de doenças víricas.

Tabela 12.5. Vacinas de uso veterinário, para as diferentes espécies animais, licenciadas para produção e comercialização no Brasil

Espécie	Vírus	Tipo
Suínos	parvovírus suíno	inativada
	herpesvírus suíno (doença de Aujeszky)	atenuada por deleção gênica (TK- e gE-); inativada (inativação de mutante viral gE-)
Eqüinos	herpesvírus eqüino tipo 1	inativada
	vírus da influenza eqüina	inativada
	vírus da encefalite Leste e Oeste	inativada
	vírus da raiva	inativada por métodos químicos
Ovinos e Caprinos	vírus do ectima contagioso	vírus vivo patogênico
	vírus da raiva	inativada por métodos químicos

Tabela 12.5. Continuação

Espécie	Vírus	Tipo
Caninos	vírus da cinomose	atenuada por passagens em células; poxvírus como vetor dos antígenos HA e F do vírus da cinomose
	adenovírus canino tipo 2 (traqueobronquite)	atenuada por passagens em células
	parvovírus canino	atenuada por passagens em células
	adenovírus canino tipo 1 (hepatite infecciosa canina)	atenuada por passagens em células
	vírus da raiva	inativada por métodos químicos
	coronavírus canino	inativada por métodos físicos
	vírus da parainfluenza tipo 2	atenuada por passagens em células
Felinos	calicivírus felino	atenuada por passagens em células
	herpesvírus felino (rinotraqueite)	atenuada por passagens em células
	vírus da panleucopenia felina	atenuada por passagens em células
	vírus da leucemia felina	antígeno recombinante purificado
	vírus da raiva	inativada por métodos químicos
Bovinos	vírus da febre aftosa	inativada por métodos químicos
	vírus da raiva	inativada por métodos químicos
	herpesvírus bovino tipo 1 e 5	inativada por métodos químicos, atenuada por termosensibilidade
	vírus da diarreia viral bovina	inativada por métodos químicos
	vírus da parainfluenza tipo 3	atenuada por alterações químicas, atenuada por termosensibilidade, inativada
	vírus sincicial respiratório bovino	atenuada (amostra viva modificada)
	rotavírus bovino	inativada por métodos químicos
	coronavírus bovino	inativada por métodos químicos
Aves	vírus da doença infecciosa da bursa	atenuada
	vírus da bronquite infecciosa aviária	atenuada, inativada
	vírus da doença de Marek	atenuada por passagens em células; vírus naturalmente atenuado (HVT)
	vírus da doença de Newcastle	atenuada, inativada
	adenovírus aviário (síndrome da queda de postura)	inativada
	vírus da encefalomielite aviária	atenuada por passagens em embriões de galinha; cepa naturalmente atenuada
	reovírus aviário	inativada, atenuada por termosensibilidade
	pneumovírus aviário	atenuada, inativada
	vírus da laringotraqueite	atenuada por passagens em células
	vírus da bouda aviária	atenuada

12 Bibliografía consultada

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 553p.
- ANDRE, F.E. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. **Vaccine**, v.21, p.593-595, 2003.
- BABIUK, L.A. et al. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.76, p.1-23, 2000.
- BRAMWELL, V.W.; Perrie, Y. The rational design of vaccines. **Drug Discovery Today**, v.10, p.1527-1534, 2005.
- BREWER, J.M. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunology Letters**, v.102, p.10-15, 2006.
- DE CLERCQ, E. **Advances in antiviral drug design**. Amsterdam: Elsevier, v.4, 2003. 230p.
- DIMMOCK, N.J.; EASTON, A.J.; LEPPARD, K.N. **Introduction to modern virology**. 5.ed. London: Blackwell, 2001. 464p.
- FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 1996. 1504p.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, K.A. DNA vaccines: immunology, application and optimization. **Annual Review of Immunology**, v.18, p.927-974, 2000.
- HENDERSON, L.M. Overview of marker and differential diagnostic test technology. **Biologicals**, v.33, p.203-209, 2005.
- KUCERS, A. et al. **The use of antibiotics**: a clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs. 5.ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1997. 1992p.
- MÄKELÄ, P.H. Vaccines, coming of age after 200 years. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.9-20, 2000.
- MOYLETT, E.H.; HANSON, I.C. Immunization. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, p.S754-S765, 2003.
- MURPHY, F.A. et al. Vaccination against viral diseases. In: _____. **Veterinary virology**. 3.ed. New York: Academic Press, 1999. Cap 13, p.225-244.
- OSHOP, G.L.; ELANKUMARAN, S.; HECKERT, R.A. DNA vaccination in the avian. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.89, p.1-12, 2002.
- PASTORET, P.P. Veterinary vaccinology. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série III, Sciences de la Vie**, v.322, p.967-972, 1999.
- PINK, J.R.; KIENY, M.P. 4th Meeting on novel adjuvants currently in/close to human clinical testing World Health Organization -- Organisation Mondiale de la Santé Fondation Mérieux, Annecy, France, 23-25 June 2003. **Vaccine**, v. 22, p.2097-2102, 2004.
- PLOTKIN, S.A. Six revolutions in vaccinology. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.24, p.1-9, 2005.
- PLOTKIN, S.A. Vaccines: past, present and future. **Nature Medicine**, v.11, p.S5-S11, 2005.
- REUBEL, G.H. et al. Suitability of canine herpesvirus as a vector for oral bait vaccination of foxes. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.225-239, 2006.
- SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. **The Veterinary Journal**, v.170, p.289-299, 2005.
- SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.469-478, 2003.
- SOUZA, A.P.D. et al. Recombinant virus as vaccines against viral diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.509-522, 2005.
- TATSIS, N.; ERLT, H.C.J. Adenovirus vaccine vectors. **Molecular Therapy**, v.10, p.616-629, 2004.
- TIZARD, I. **An introduction to veterinary immunology**. 2.ed., Philadelphia, W.B. Saunders, 1982, 363p.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.43-54, 1996.

PARTE II

VIROLOGIA ESPECIAL

1 Introdução	363
2 Classificação	363
3 Estrutura do vírion e do genoma	364
4 Replicação	366
5 Circovírus de interesse veterinário	367
5.1 Circovírus suíno tipo 2	368
5.1.1 Epidemiologia	368
5.1.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	369
5.1.3 Diagnóstico	371
5.1.4 Controle e profilaxia	371
5.2 Anemia infecciosa das galinhas	372
5.2.1 Epidemiologia	372
5.2.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	373
5.2.3 Diagnóstico	374
5.2.4 Prevenção e controle	374
6 Bibliografia consultada	374

1 Introdução

Os membros da família *Circoviridae* possuem vírions icosaédricos, sem envelope, com 14 a 26 nm de diâmetro. O genoma DNA circular de fita simples (1.7-2.3 kb) é um dos menores entre os vírus animais. Os circovírus são encontrados com frequência em várias espécies, mas os suínos se constituem nos únicos mamíferos nos quais o vírus já foi isolado. A família dos circovírus animais é composta por três vírus aviários e dois suínos. Os circovírus aviários são: o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), o vírus da doença das penas e bicos dos psitacídeos (BFDV) e o circovírus dos pombos (PiCV). Dois circovírus já foram identificados em suínos: o PCV-1 e o PCV-2. O PCV-1 é um contaminante comum de células de cultivo de rim (PK-15) e não tem sido associado com doença em animais. Já o PCV-2 tem sido associado com diferentes síndromes clínicas, denominadas conjuntamente de circovirose suína. Com exceção do PCV-1, as infecções com os circovírus animais são associadas com doenças potencialmente fatais. Nessas doenças, as lesões nos tecidos linfóides e imunossupressão são frequentes.

Na década de 1990, houve várias descrições de outros circovírus ou *circovirus-like* vírus, principalmente em aves (canários, avestruzes, gansos, dentre outros). O único circovírus humano até hoje classificado, o torquetenovírus (TTV), foi isolado de casos de hepatite pós-transfusão. Esse vírus foi previamente classificado na famí-

lia *Circoviridae* e recentemente foi reclassificado em um novo gênero, denominado *Anellovirus*. A exemplo dos circovírus de animais, os TTV possuem vírions pequenos, não-envelopados, com DNA circular de fita simples. O genoma possui entre 3.3 e 3.9 kb. Os TTV são vírus ubíquos e 60 a 100% de pessoas saudáveis mundialmente já tiveram contato com o vírus. Semelhanças genômicas também existem entre os circovírus animais (PCV-1) e vírus de plantas (*Geminiviridae*), atualmente reclassificados como nanovírus de plantas.

2 Classificação

Os circovírus foram identificados, pela primeira vez, em 1974, como contaminantes de uma linhagem de células renais de suínos (PK-15) e foram inicialmente descritos como “partículas semelhantes aos picornavírus”. Posteriormente, a caracterização do ácido nucléico extraído de partículas víricas purificadas demonstrou que os vírions continham uma molécula de DNA de fita simples circular. O nome circovírus suíno ou circovírus porcino (PCV) foi proposto por Tischer e colegas (1974), em reconhecimento ao primeiro vírus animal a possuir um genoma DNA circular. Essa denominação foi, posteriormente, adotada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) quando os membros da *Circoviridae* foram descritos como uma família de vírus (Tabela 13.1). Em seguida, o BFDV e o CAV foram também caracterizados e classificados conjunta-

Tabela 13.1. Reconhecimento e classificação de membros da família *Circoviridae*

Vírus	Gênero	Espécie	Ano de reconhecimento (caracterização)	Doença
PCV1	<i>Circovirus</i>	Suínos	1974 (1982)	Nenhuma
CAV	<i>Gyrovirus</i>	Galinha	1979 (1989)	Anemia infecciosa das galinhas
BFDV	<i>Circovirus</i>	Pássaros psitacídeos	1984 (1989)	Doença das penas e bicos dos psitacídeos
PiCV	<i>Circovirus</i>	Pombos	1993 (2000)	Mortalidade associada com definhamento e anorexia
PCV2	<i>Circovirus</i>	Suínos	1997 (1998)	Circovirose suína ou síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS)

Fonte: adaptada de Todd (2000).

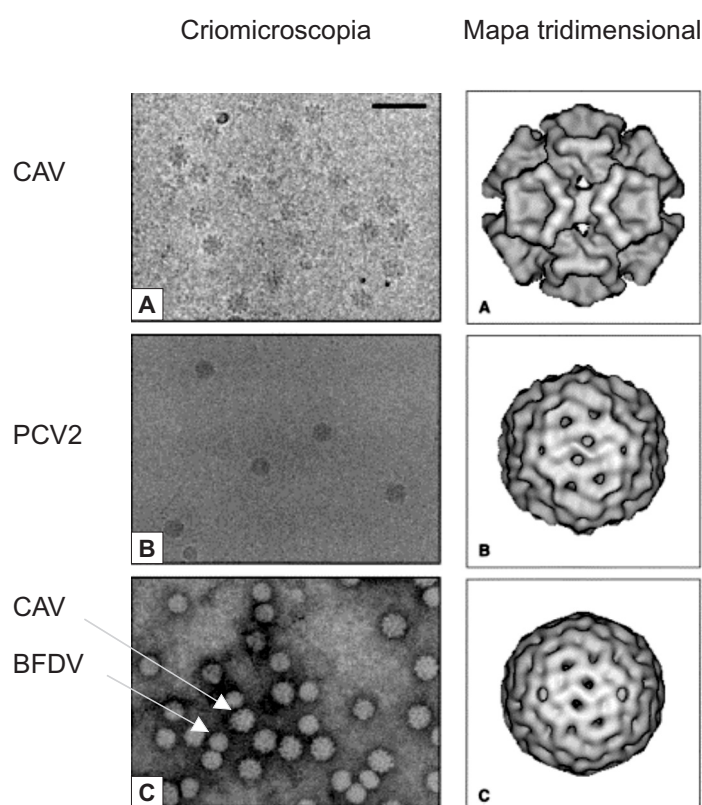
mente na família *Circoviridae*. O BFDV e os PCVs são classificados no gênero *Circovirus*, enquanto o CAV é o único membro do gênero *Gyrovirus*, com base em diferenças moleculares. Um segundo circovírus suíno, o PCV-2, com características antigênicas e genéticas diferentes do PCV-1, foi descrito posteriormente e está comprovadamente associado com doença em suínos.

3 Estrutura do vírion e do genoma

Os circovírus possuem vírions pequenos (14-26 nm de diâmetro), icosaédricos, sem envelope. Pequenas diferenças estruturais podem ser observadas entre os vírions dos dois gêneros (Figura 13.1). Em geral, os vírions do CAV são um pouco maiores do que os do PCV-2 e do BFDV (Tabela 13.2). A superfície do CAV também possui um aspecto diferenciado quando analisada em estudos de mapas tridimensionais com amos-

tras crio-preservadas. Os capsídeos desses vírus possuem uma estrutura icosaédrica, contendo 60 moléculas da proteína do capsídeo arranjadas em 12 unidades pentaméricas. Porém, enquanto o PCV-2 e o BFDV possuem capsômeros planos bastante similares, os capsômeros do CAV possuem aparência pontiaguda em forma de trompete. Essas características morfológicas distintas demonstram que os vírus dos gêneros *Gyrovirus* e *Circovirus* não são estruturalmente relacionados.

O capsídeo do CAV é composto por cópias múltiplas de uma única proteína viral, a VP1. A VP1 possui uma região N-terminal altamente básica de 50 aminoácidos, que interage com o DNA viral encapsidado. A região C-terminal da VP1 possui seqüências funcionais associadas com a replicação do DNA pelo mecanismo de círculo rolante (RCR ou *rolling circle*), o que indica que a VP1 desempenha tanto papéis estruturais como funcionais.



Fonte: Crowter et al. (2003).

Figura 13.1. Vírions da família *Circoviridae*. Esquerda: criomicroscopia eletrônica do CAV (A); PCV-2 (B) e CAV/BFDV (C). Direita: mapa tridimensional dos respectivos vírions.

Tabela 13.2. Características físicas e bioquímicas dos circovírus

Vírus	CAV	PCV1	PCV2	BFDV
Diâmetro da partícula (nm)	19.1-26.5	16.8-20.7	15-16	14-20.7
Densidade (g/ml em CsCl)	1.33-1.37	1.33-1.37	-	1.378
Coeficiente de sedimentação	91S	57S	-	-
Extensão do genoma (nt)	2298/2319	1759	1768	1993
Massa da proteína do vírion (kDa)	50	36	28	27, 23, 17

Fonte: adaptada de Todd (2000).

O capsídeo do PCV-2 consiste de múltiplas cópias de uma proteína codificada pela ORF2, a qual encapsida um genoma de 1.7 kb. As proteínas codificadas pela ORF2 do PCV-1 e do PCV-2 possuem 66% de identidade de aminoácidos. Essa proteína possui uma região N-terminal básica, capaz de interagir com o DNA viral, porém é desprovida da região envolvida na RCR. A replicação do genoma do PCV-2 é realizada com auxílio de outra proteína (Rep'). O BFDV possui uma organização genômica semelhante aos PCVs, e a proteína codificada pela sua ORF2 apresenta uma identidade de aminoácidos de 26% com a proteína homóloga do PCV-2.

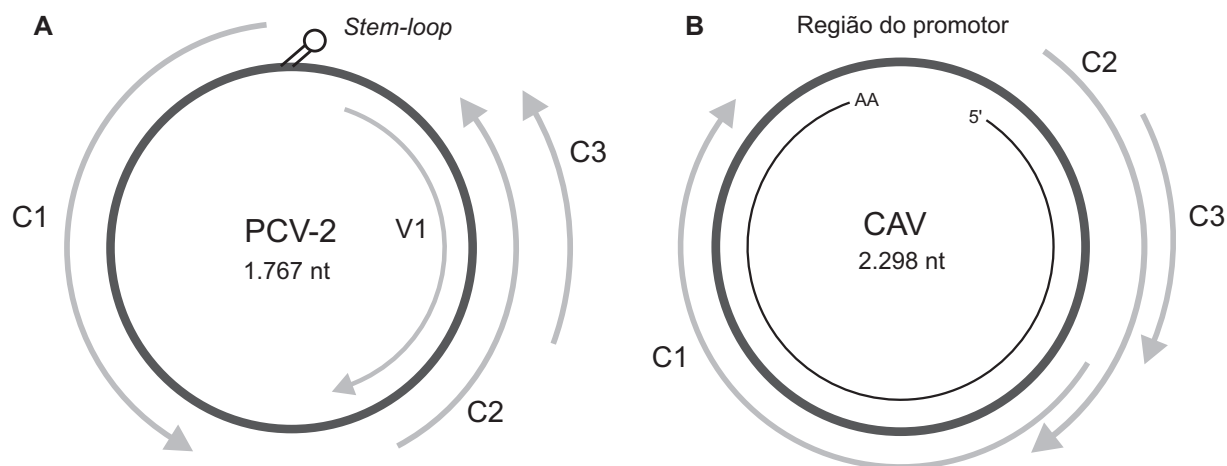
As partículas dos circovírus podem ser purificadas em gradientes de cloreto de Césio a uma densidade de 1.35 a 1.38 g/ml e possuem um coeficiente de sedimentação de 91S (CAV) e de 57S (PCV-1) em gradiente de sacarose. Os circovírus são extremamente estáveis sob condições ambientais. Cultivos celulares, contendo esses vírus, conservam o seu potencial infectivo após incubação a 56 ou 70°C, e tratamentos a pH 3 ou clorofórmio, por 15 minutos. Essa resistência à inativação desempenha um importante papel na epidemiologia do agente e possui implicações para o controle das infecções por esses vírus. As principais características físico-químicas dos vírions dessa família estão apresentadas na Tabela 13.2.

O genoma dos circovírus é uma molécula de DNA de fita simples circular, com 1.7 kb (circovírus suíno), 1.99 kb (PFDV) ou 2.3 kb (CAV). O genoma dos PCVs e do PFDV possui genes que são codificados tanto pela cadeia de sentido ge-

nômico como pela cadeia complementar, estratégia denominada *ambissense*. No genoma dos PCVs, três ORFs estão presentes no sentido do DNA complementar ao genoma (C1, 2 e 3) e uma ORF está presente na sequência correspondente ao DNA genômico (V1) (Figura 13.2A).

O genoma do CAV possui polaridade negativa, ou seja, as sequências codificadoras estão presentes no DNA complementar (e nos mRNAs transcritos a partir da cópia genômica). O DNA complementar apresenta três ORFs que codificam uma proteína estrutural (VP1) e duas não-estruturais (VP2 e VP3) (Figura 13.2B). A VP3 está associada com a indução de apoptose em células do timo de galinhas infectadas. A VP2 atua auxiliando a VP1 a adotar uma conformação adequada para a construção do capsídeo. Todos os isolados do CAV identificados até o presente pertencem ao mesmo sorotipo, e todos são patogênicos quando inoculados experimentalmente em animais.

Os genomas do PCV-1 e PCV-2 são semelhantes na sua organização e apresentam 76% de homologia. Nesses genomas, existem seis ORFs potenciais, mas apenas três codificam proteínas já identificadas: ORF1, ORF2 e ORF3 (Figura 13.2A). A ORF1 codifica uma proteína, a Rep, essencial para replicação do DNA viral, enquanto a ORF2 codifica a proteína do capsídeo. A ORF3 codifica uma proteína viral não essencial para replicação, mas com um papel importante na indução de apoptose. A análise do genoma de vários isolados do PCV-2 da Europa, América do Norte, sudeste asiático e do Brasil demonstraram que esses vírus são muito semelhantes entre si,



Fonte: adaptado de Todd et al. (2001).

Figura 13.2. Estrutura e organização do genoma dos circovírus. A) Estrutura e regiões codificantes do genoma do PCV-2; B) Estrutura e regiões codificantes do genoma do CAV; C - ORFs presentes no DNA complementar; V - ORF presente no DNA de sentido genômico. No genoma do CAV, o mRNA correspondente as três ORFs está representado internamente.

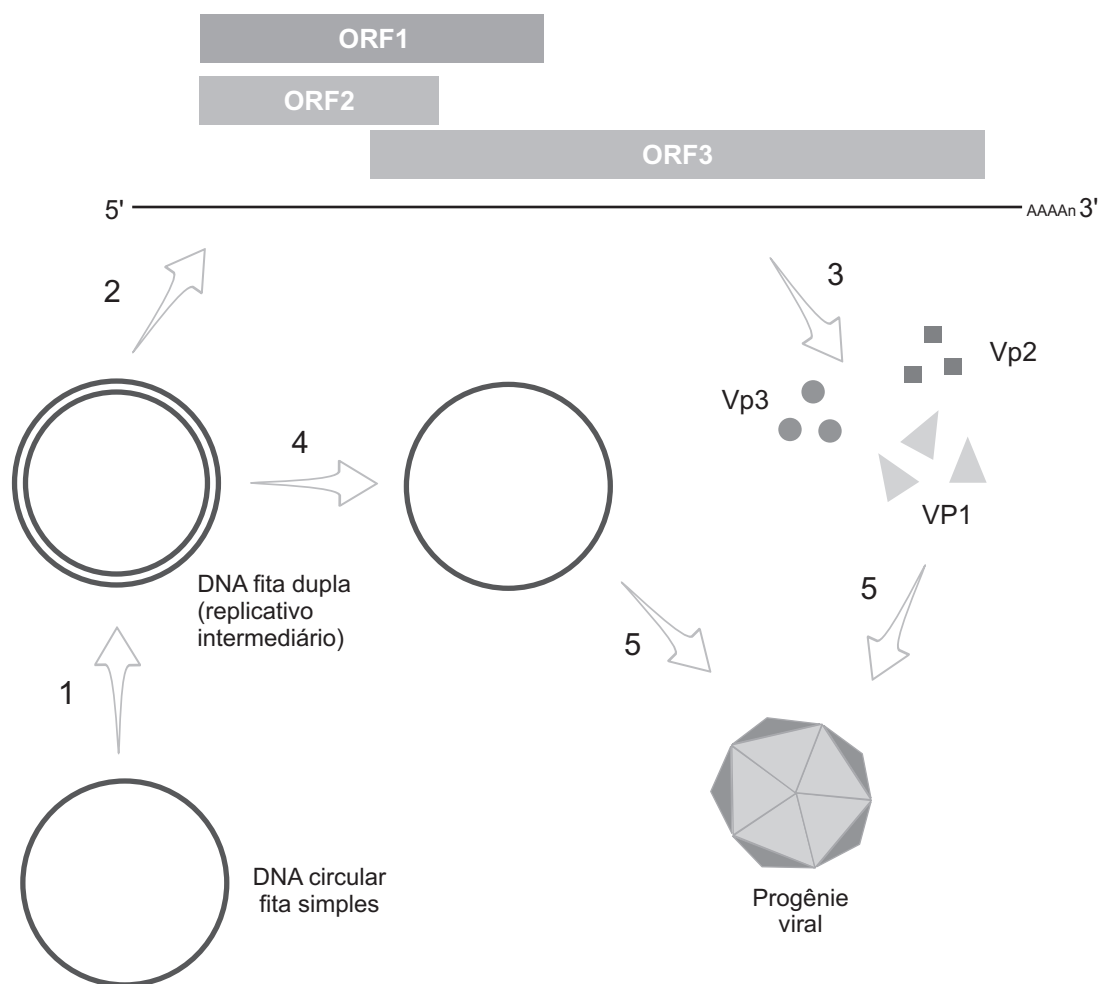
com homologia média de 96% entre os isolados. Estudos recentes, realizados na Suécia e Canadá, indicam a existência de dois genótipos diferentes do PCV2 (PCV2a e PCV2b) com uma alta identidade de nucleotídeos.

O genoma dos circovírus apresenta algumas características em comum, como a presença de uma estrutura secundária em forma de grampo (*stem-loop*) que está associada com a iniciação da replicação do DNA viral.

4 Replicação

Os circovírus são os menores vírus capazes de replicação autônoma em células de mamíferos. Devido à sua simplicidade genômica e estrutural, a replicação requer a participação de várias proteínas das células hospedeiras e ocorre durante a fase S do ciclo celular. A replicação do genoma ocorre no núcleo das células e envolve a síntese de uma molécula de DNA de fita dupla (replicativo intermediário). Após a síntese do replicativo intermediário, o genoma é, provavelmente, replicado pelo mecanismo de círculo rolante.

A replicação do genoma do CAV se inicia logo após a penetração do vírus na célula, pela síntese da fita complementar de DNA (Figura 13.3). Essa molécula de DNA de fita dupla possui 2.298 ou 2.319 pares de bases, de acordo com a presença de quatro ou cinco seqüências repetidas de 21 nucleotídeos (nt). Uma seqüência "TATA" localizada na posição 324 e outros sítios de ligação de fatores de transcrição possuem papel importante na regulação da transcrição do genoma (região do promotor) e constituem a parte não-transcrita do genoma do CAV (Figura 13.2B). Após a sua síntese, o DNA replicativo intermediário é transcrito em um RNA mensageiro (mRNA) de 2.1 kb. Este mRNA é policistrônico e contém três ORFs sobrepostas entre si, cada uma codificando uma das três proteínas do CAV: VP1 (51.6 kDa), VP2 (24 kDa) e VP3 (13.6 kDa). A partir do DNA replicativo intermediário, são produzidas moléculas de DNA de fita simples circulares, correspondentes ao DNA genômico. Essas moléculas são encapsidadas por múltiplas cópias da proteína VP1 (Figura 13.3). A morfogênese ocorre no núcleo por mecanismos ainda não esclarecidos.



Fonte: adaptado de Brentano (2000).

Figura 13.3. Ilustração esquemática do ciclo replicativo do CAV. A etapa inicial é a síntese da cadeia de DNA complementar ao DNA genômico (1). O DNA de fita dupla (replicativo intermediário) é transcrito pela maquinaria celular, originando um mRNA de 2.1 kb (2). Este mRNA contém três ORFs e é traduzido em três proteínas (3). O DNA de fita dupla serve de molde para a replicação, com a produção de cópias genômicas do DNA (4). Este DNA é, então, encapsulado por múltiplas cópias da VP1 (5).

Os PCVs replicam em uma variedade de células primárias e de linhagem suína e, geralmente, não produzem citopatologia evidente. Por isso, têm sido freqüentemente detectados como contaminantes de cultivos celulares. Essa propriedade possui implicações também para o diagnóstico, pois o isolamento viral em cultivo deve ser necessariamente seguido da detecção de antígenos ou de ácidos nucleicos virais nas células inoculadas.

O CAV replica em células MDCC-MSB1 (linhagem linfoblástico derivada de tumores de doença de Marek). Em passagens iniciais, o vírus

não produz efeito citopático. O CAV pode também ser cultivado em pintos de um dia e em ovos embrionados de galinha.

5 Circovírus de interesse veterinário

As infecções com os quatro membros da família *Circoviridae* são associadas com doenças potencialmente fatais em animais. Este capítulo abordará apenas as duas doenças mais importantes para a produção pecuária no Brasil: as infecções pelo PCV-2 e pelo CAV.

5.1 Circovírus suíno tipo 2

A síndrome da circovirose suína é a denominação dada ao conjunto de manifestações clínicas causadas pelo PCV-2, um vírus que está disseminado em rebanhos suínos de todo o mundo. Esta doença foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil, em 2000, no Laboratório de Sanidade da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, SC. Atualmente, a circovirose é considerada uma doença endêmica no país, e um aumento do número de casos clínicos com confirmação laboratorial tem sido observado. Apesar de ter sido reportada pela primeira vez em 2000, a circovirose suína foi diagnosticada em materiais de arquivo de 1988, sugerindo que a infecção já estava presente anteriormente no Brasil. Os fatores que determinaram o surgimento da circovirose como uma doença emergente, nos últimos anos, permanecem desconhecidos.

Seis formas clínicas ou síndromes estão relacionadas com a circovirose suína, sendo a síndrome multissistêmica do definhamento (SMDS) a mais freqüente e a mais bem caracterizada.

5.1.1 Epidemiologia

A SMDS foi diagnosticada inicialmente em rebanhos de alto padrão sanitário no Canadá, porém também pode atingir plantéis de ciclo completo ou unidades produtoras de leitões de tamanhos variados (maiores que 50 matrizes) ou, ainda, unidades de segundo e terceiro sítios de produção (crechários e terminadores). Os suínos são mais freqüentemente afetados entre as 5 e 16 semanas de idade, e a morbidade e mortalidade variam de acordo com a fase em que a doença surge e com o manejo da criação. Cerca de 50% dos suínos afetados morrem em menos de oito dias. Os demais animais podem sobreviver, mas a maioria evolui para o definhamento extremo, sem perspectiva de recuperação. Poucos animais sobrevivem e, mesmo assim, apresentam um mau desempenho produtivo.

O principal problema da SMDS é a sua duração nos rebanhos, podendo persistir por vários meses se medidas apropriadas de controle não forem adotadas. Na média, há um aumento de três vezes nas taxas de mortalidade na creche e

no crescimento-terminação. Em alguns rebanhos, essas taxas retornam à normalidade dentro de alguns meses.

Co-fatores infecciosos e não-infecciosos, assim como fatores de risco predisponentes ao estresse, como densidade elevada, variações térmicas extremas, frio, baixa qualidade do ar, ar seco e misturas de lotes com idades diferentes podem exacerbar os sinais e a severidade da doença. Nos países onde o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) é endêmica, a co-infecção com o PRRSV foi detectada na maioria dos plantéis, exacerbando a SMDS. Outros agentes, como o *Haemophilus parasuis*, até então pouco diagnosticados na suinocultura brasileira, passaram a possuir grande importância após o surgimento da circovirose. A infecção pelo parvovírus suíno (PPV) também parece ser um importante co-fator para o agravamento da SMDS.

A identificação e classificação de isolados do PCV-2, oriundos de vários rebanhos do mundo em dois genótipos diferentes (PCV2a e PCV2b), indicam diferenças na virulência, o que é importante na evolução da infecção e epidemiologia da circovirose suína.

O PCV-2 pode ser transmitido de forma horizontal ou vertical, sendo a via oronasal a rota mais freqüente de transmissão. O PCV-2 é excretado nas fezes por até 13 dias após a infecção. Os circovírus são muito resistentes às condições ambientais e aos desinfetantes. Portanto, o contato direto ou indireto com suínos infectados, instalações, equipamentos, pessoal contaminado e fômites também podem transmitir o agente. O DNA do PCV-2 pode ser detectado no sêmen de machos infectados, mas ainda não se detectou a presença de infectividade nessa secreção. Em caso positivo, esses reprodutores poderiam representar uma fonte potencial de disseminação da infecção para matrizes, pela monta natural ou inseminação artificial.

Estudos de prevalência, formas de transmissão, excreção e tropismo do vírus ainda estão sendo realizados. Estudos sorológicos no Brasil e em outros países indicaram que anticorpos contra o PCV-2 estão presentes na maioria dos rebanhos suínos (rebanhos SPF, unidades de terminação e criações de fundo de quintal) e a maior parte dos animais se infecta ao redor da terceira e quarta

semanas após o desmame. Suínos selvagens, como os javalis, também são susceptíveis à infecção pelo PCV-2 e desenvolvem a SMDS quando submetidos a estresse e a outros fatores de risco.

5.1.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

O PCV-2 geralmente infecta os suínos com 5 a 16 semanas de idade, freqüentemente pela via oronasal. O vírus infecta células do sistema imunológico, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas, e é capaz de replicar em vários tipos celulares, preferencialmente em células com divisão ativa. Após a infecção e replicação em células do sistema imunológico, o PCV-2 produz viremia e se dissemina sistemicamente no organismo. Devido à incapacidade do animal

infectado desenvolver uma resposta imunológica efetiva, o PCV-2 pode infectar células em vários órgãos, produzir lesões e, assim, agravar o quadro clínico. Um desequilíbrio das substâncias mediadoras da imunidade, morte de linfócitos e falhas na reposição de células linfóides colaboram para esta imunodeficiência. Ainda não está claro porque apenas uma parcela dos leitões infectados desenvolve a doença. A explicação pode estar relacionada com a presença de co-fatores infecciosos e não-infecciosos, que são responsáveis pelo aumento dos níveis de replicação do PCV-2 nos suínos com SMDS (Figura 13.4). Sabe-se que os animais que desenvolvem a infecção subclínica apresentam uma carga viral inferior àquela presente nos animais que desenvolvem a SMDS. Estes animais também desenvolvem títulos superiores de anticorpos neutralizantes contra o PCV-2.

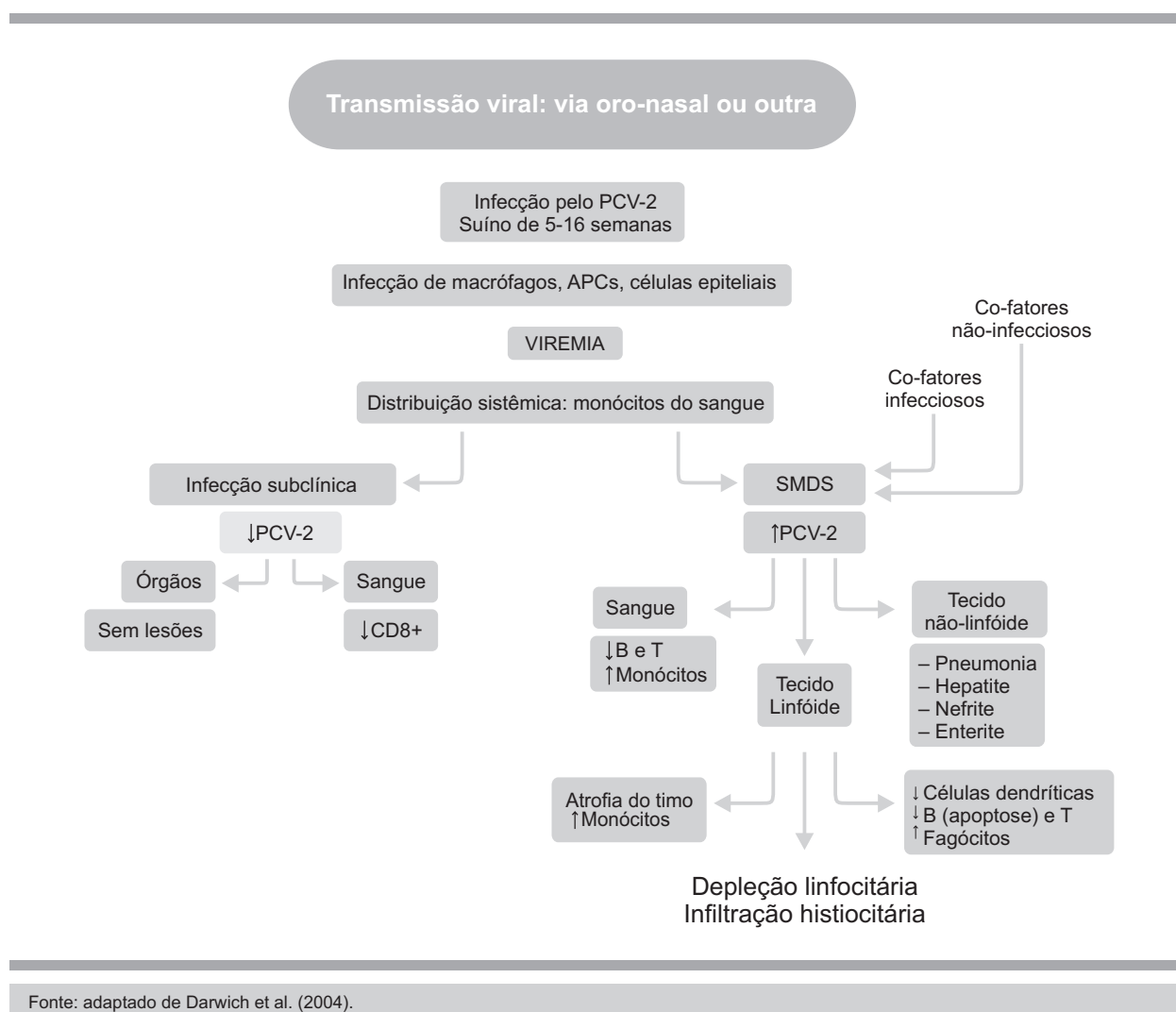


Figura 13.4. Patogenia das infecções pelo circovírus suíno -2 (PCV-2).

Do ponto de vista clínico, três fatores principais são sugeridos para explicar a grande variação no número de animais afetados por lote: o efeito individual, o efeito leitegada e o efeito manejo (fatores de risco). O efeito individual é decorrente da genética individual do animal, da herança imunológica e da sua capacidade de responder adequadamente às infecções. O efeito leitegada sugere um importante papel da matriz como possível reservatório do vírus e/ou na transferência de imunidade passiva aos leitões. O efeito manejo ou fatores de risco causadores de estresse, como densidade elevada, ambiente inadequado, baixa qualidade do ar, da água e da ração, misturas de leitões com procedências e idades diferentes, falhas na limpeza/desinfecção e a não-realização de vazios sanitários são muito importantes. A consideração desses fatores é indispensável no planejamento de medidas de controle da SMDS.

A SMDS é a forma clínica mais importante associada com o PCV-2, mas o vírus também está relacionado com outras manifestações clínicas. Os sinais mais importantes são o emagrecimento progressivo, anorexia, aumento de volume dos linfonodos, diarreia crônica e dispnéia, que não regredem com tratamentos antimicrobianos. Palidez nas mucosas, icterícia e úlcera gástrica também podem ocorrer. Outros sinais, alguns deles relacionados com infecções secundárias – como a pneumonia enzoótica, colibaciloses, doença de Glasser (*H. parasuis*), salmonelose, infecções de pele por *Staphylococcus* – podem estar presentes. Infecções causadas por outros vírus, como o PPV e o PRRSV, podem exacerbar os sinais clínicos, resultando em doença mais severa e taxa maior de mortalidade.

As lesões macroscópicas mais importantes incluem a hipertrofia de linfonodos (inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos), atrofia do timo e ausência de colapso pulmonar. Entretanto, essas lesões nem sempre estão presentes e, portanto, não podem ser utilizadas como um indicador seguro da SMDS. O infarto dos linfonodos geralmente acompanha os estágios precoces da infecção, e esses órgãos podem retornar ao tamanho normal ou mesmo reduzido. Alguns linfonodos podem apresentar

pequenas áreas multifocais de necrose (pontos branco-amarelados), provavelmente devido a infecções concomitantes. O fígado de animais ictericos também pode apresentar hipotrofia e áreas de descoloração. Pontos multifocais brancacentos podem ser observados na superfície e no parênquima dos rins, porém a hipertrofia renal pode ser apenas discreta. Lesões de pele (manchas avermelhadas) também podem ser observadas em alguns casos. Muitos animais com sinais de definhamento apresentam úlcera gastresofágica, responsável por hemorragias internas e pela palidez da pele e das mucosas. Alterações como poliserosite, hepatização pulmonar e colite podem ser observadas, dependendo das infecções intercorrentes.

O PCV-2 também está associado com a forma epidêmica da síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS) e pode ser identificado em tecidos de suínos afetados por essa síndrome. Geralmente, a SDNS é a primeira manifestação clínica da infecção pelo PCV-2 observada em um rebanho, que é, então, seguida pela SMDS. A SDNS também pode ocorrer isoladamente, acometendo principalmente suínos com idade superior a três meses. Os sinais da SDNS são: anorexia, edema subcutâneo ventro-caudal e áreas eritematosas na pele dos membros pélvicos e na região perianal. Ainda não está esclarecida a participação do PCV-2 na patogenia da SDNS. Além das lesões necróticas da pele, ocorrem lesões bilaterais nos rins, que aparecem pálidos, com severa hipertrofia, aderência difusa da cápsula, superfície irregular e, às vezes, petéquias disseminadas pela cortical. Estrias brancacentas, que se prolongam do córtex até a medula renal, são observadas ao corte. Em alguns casos não são observadas lesões macroscópicas, e o diagnóstico da doença é realizado pela detecção de vasculite necrótica sistêmica.

O PCV-2 está geralmente associado com outros agentes patogênicos em infecções mistas. Isoladamente, o agente pode causar pneumonias, enterites e distúrbios reprodutivos. Essas infecções se caracterizam por pneumonia intersticial proliferativa e necrosante; enterite granulomatosa; falhas reprodutivas que resultam em abortos, mumificação fetal, natimortalidade e mortalidade

de leitões pré-desmame com miocardite. Tremor congênito em leitões e doenças do sistema nervoso central (SNC) que levam leitões desmamados à morte súbita também já foram relatados.

A confirmação do PCV-2 como o agente etiológico da SMDS veio de infecções experimentais que resultaram em: a) lesões características de SMDS em suínos inoculados; b) presença de altas concentrações de antígenos virais em tecidos; c) presença do DNA viral nas lesões; d) isolamento do PCV-2 dos animais infectados; e) desenvolvimento de anticorpos específicos contra o agente. Nas infecções experimentais em que o PCV-2 é o único agente, os sinais clínicos e as lesões foram brandos. Isso indica que co-fatores infecciosos e não-infecciosos são importantes para a manifestação do quadro clínico observado a campo. Portanto, parece que o PCV-2 é necessário, porém não suficiente para reproduzir a doença, o que indica que a circovirose é uma doença multifatorial.

5.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da SMDS deve ser realizado com base na análise dos sinais clínicos, lesões macro e microscópicas e detecção de antígenos ou ácidos nucleicos virais nos tecidos. A imunohistoquímica (IHC) e reação em cadeia da polimerase (PCR) são muito utilizadas para demonstrar a presença do agente.

Como esta síndrome cursa com sinais variados e produz imunossupressão que predispõe a ocorrência de outras doenças, três aspectos devem ser considerados para o diagnóstico:

- sinais clínicos: emagrecimento progressivo, problemas respiratórios e/ou diarreia;
- lesões macroscópicas: aumento de volume de linfonodos, hipotrofia do timo e consolidação pulmonar com pulmões não-colabados. Lesões microscópicas: depleção de linfócitos nos linfonodos e baço, infiltração de histiócitos, pneumonia intersticial. A presença de corpúsculos de inclusão basofílicos no citoplasma de macrófagos possui valor diagnóstico limitado, pois aparece somente em cerca de 30% dos casos;
- detecção de antígenos ou de ácidos nucleicos do agente associados com as lesões, por IHC ou PCR, respectivamente.

O isolamento do vírus pode ser realizado em células de linhagem, tais como: PK-15, ST (testículo suíno) e SK-6 (rins de suíno). Como o vírus replica com mais eficiência em células com replicação ativa, o tratamento de células de cultivo com substâncias indutoras do ciclo celular, como a D-glucosamina, é útil para induzir níveis de replicação que permitam a multiplicação do agente. O PCV-2 não produz efeito citopático em células de cultivo, sendo necessária a detecção de antígenos virais por imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX). Anticorpos monoclonais específicos para o PCV-2 e PCV-1 são utilizados nesses testes.

Anticorpos presentes no soro podem ser detectados por imunofluorescência indireta (IFI) ou por imunoperoxidase indireta, podendo ocorrer reações cruzadas entre o PCV-1 e o PCV-2. Testes de ELISA específicos para o PCV-2 têm sido utilizados em estudos de prevalência, porém não são recomendados para o diagnóstico da doença.

Em resumo, o diagnóstico definitivo de SMDS deve ser realizado pela identificação de antígenos ou ácidos nucleicos virais, associados com o quadro clínico-patológico compatível com as descrições da enfermidade.

O diagnóstico diferencial deve ser realizado para alguns patógenos que também produzem sinais clínicos semelhantes, principalmente o desmame. Inclui-se, nesses casos, a diarreia causada por *Lawsonia* e *Brachyspira*. Devido à possível co-infecção pelo PCV-2 e PRRSV, algumas lesões atribuídas ao PRRSV podem ter sido causadas pelo PCV-2.

5.1.4 Controle e profilaxia

Vacinas específicas para o PCV-2 estão apresentando resultados promissores em países da Europa e América do Norte. No entanto, não estão disponíveis comercialmente no Brasil, o que dificulta o controle da doença. As vacinas, em diferentes preparações, são disponíveis para uso em porcas marrãs. A vacinação das fêmeas potencialmente confere proteção para a síndrome da circovirose suína através da transferência passiva de anticorpos. As vacinas também são indicadas para uso em leitões, com aplicação antes da fase de maior exposição ao agente.

O controle da circovirose baseia-se na identificação e eliminação dos fatores de risco e na redução dos fatores de estresse. Fatores complicadores para o controle da enfermidade incluem a grande resistência do agente no meio ambiente e a inexistência de tratamento específico para os suínos afetados. Os melhores resultados para a redução da mortalidade e das perdas podem ser obtidos através de mudanças de manejo baseadas nos 20 pontos de *Madec*, o que permite reduções de taxas de mortalidade abaixo dos 5% em creches. A observância das recomendações de *Madec* melhora a biossegurança da granja e reduz o potencial patogênico de outros agentes de doenças que afetam os suínos, especialmente os entéricos e os respiratórios.

Esses pontos podem ser resumidos em:

- redução do estresse: especialmente ambiental (variações de temperatura, correntes de ar, excesso de gases e excesso de densidade animal);
- limitação dos contatos entre suínos: evitar enxertias e misturas de leitões com idades e/ou origens diferentes, e pronta remoção dos animais doentes para baias-hospital;
- adoção de medidas de higiene: adotar o sistema “todos dentro-todos fora” com vazio sanitário rigoroso entre lotes, utilizando desinfetantes eficazes para o PCV-2, além de melhorar as medidas de biossegurança;
- boa nutrição: assegurar-se da ingestão adequada de colostro nas primeiras horas de vida e de nutrição de boa qualidade para auxiliar a fisiologia do sistema imunológico (uso de antioxidantes, por exemplo);
- estabilização imunitária: auto-reposição, adaptação das marrãs por seis semanas antes da cobertura e realização de um programa de vacinação efetivo das fêmeas para as outras enfermidades prevalentes no rebanho. Outra recomendação importante é a ampliação da idade de desmame para acima de 25 dias.

Medidas básicas de higiene, como a limpeza e desinfecção de instalações, seguidas de vazio sanitário, são prioritárias. Os circovírus são muito resistentes aos desinfetantes de uma maneira geral, principalmente por ficarem protegidos na matéria orgânica. Dessa forma, é importante que

se realize uma limpeza geral com o uso de detergentes, antes do uso dos desinfetantes. Estes devem ser utilizados na dosagem recomendada para inativação do vírus. Os desinfetantes mais eficazes para o PCV-2 são aqueles à base de uma mistura de peroximonosulfato de potássio e cloreto de sódio, seguidos pelos desinfetantes à base de hidróxido de sódio, de amônia quaternária, de hipoclorito de sódio e dos derivados fenólicos.

Para prevenir a entrada do PCV-2 em granjas livres, deve-se seguir à risca as medidas de biossegurança. Essas medidas devem ser tanto externas (controle de visitantes, veículos, acesso de animais, introdução de suínos e sêmen), quanto internas (uso de desinfetantes, controle de vetores, manejo das instalações e redução de estresse). Estudos recentes demonstraram a presença do PCV-2 no sêmen de cachos de algumas centrais de inseminação artificial do país, achado que deve merecer atenção especial.

5.2 Vírus da anemia infecciosa das galinhas

A anemia infecciosa das galinhas (AIG) é uma doença de aves jovens, que produz perdas significativas, principalmente em frangos de corte. Apesar de a infecção ser freqüente em galinhas poedeiras, a doença clínica não é muito comum nessa categoria. A enfermidade é mais freqüente em pintinhos jovens, que se infectam de forma vertical (via ovo) a partir de matrizes com a infecção subclínica. O CAV associado à AIG foi identificado, pela primeira vez, no Japão e, atualmente, está disseminado mundialmente. No Brasil, o CAV já foi identificado e a doença foi reproduzida em aves SPF (*specific pathogen free*). Anticorpos específicos contra o CAV foram detectados no soro de matrizes e frangos de corte no início dos anos 1990 no Sul do Brasil.

5.2.1 Epidemiologia

O CAV está presente em praticamente todos os países que possuem avicultura comercial, e a infecção é mais freqüente em lotes de matrizes acima de 20 a 25 semanas de idade. As galinhas se constituem na única espécie susceptível à in-

fecção, e a doença não apresenta riscos à saúde pública. No Brasil, estudos realizados em vários estados demonstraram uma soroprevalência de aproximadamente 90% nas matrizes de corte. A transmissão do CAV ocorre principalmente de forma vertical, da matriz para o embrião, mas o agente também pode ser transmitido horizontalmente pela via fecal-oral. O vírus é excretado nas fezes e pode contaminar a cama e instalações, podendo persistir no ambiente devido à sua alta resistência à inativação. A maioria das matrizes se infecta ao redor das cinco semanas de idade, provavelmente pela ingestão de material contaminado.

As taxas de morbidade, mortalidade e a severidade da doença variam de acordo com o título do vírus, via de infecção, com a idade das aves, imunidade passiva, presença de co-fatores infecciosos (outros vírus imunossupressores) e não-infecciosos (ambiência, estresse, nutrição). Além desses fatores, alguns relatos indicam a existência de amostras do CAV de maior patogenicidade e virulência que podem produzir quadros clínicos mais severos.

As matrizes infectadas, geralmente, não apresentam sinais clínicos, e os primeiros sinais da doença aguda são observados quando os pintinhos estão com 7 a 14 dias de idade. As aves geralmente ficam deprimidas, apresentando taxas de morbidade próximas a 100% e de mortalidade entre 5 e 15%, apesar de taxas de até 60% já terem sido relatadas.

5.2.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

O CAV infecta células do timo e da medula óssea, mas pode também ser detectado em outras células linfóides. A replicação do CAV ocorre em células precursoras dos linfócitos T no córtex do timo, em células T maduras no baço, e em hemocitoblastos na medula óssea. A infecção de células progenitoras da medula, tais como os eritroblastos, hemocitoblastos e trombocitoblastos, resulta em anemia e hemorragias. O efeito imunossupressor do CAV se deve à depleção de linfócitos e a alterações na produção de mediadores químicos da resposta imunológica. Por isso, surtos da

doença podem ser acompanhados por infecções bacterianas secundárias (dermatites e colibaciloses), pelo agravamento de outras doenças imunossupressoras (doença de Gumboro e reovirose) e por falhas vacinais a outras infecções virais, como as doenças de Marek e Newcastle.

Em aves com idade superior a três semanas, a infecção geralmente é subclínica, mas, mesmo assim, pode causar perdas significativas. A infecção produz alterações na função de macrófagos e de outras células responsáveis pela fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas.

A forma clínica mais importante associada com a infecção pelo CAV ocorre em pintinhos jovens. Nesses animais, são observados diversos graus de anemia, palidez na musculatura, barbeta e crista, depressão e desuniformidade do lote. Esses sinais podem ser confundidos com outras doenças. Hemorragias musculares e dermatites secundárias também podem ocorrer.

As lesões macroscópicas mais importantes incluem hipotrofia de timo e alterações da coloração da medula do fêmur. Hemorragias musculares, subcutâneas ou no proventrículo podem também ser observadas. A co-infecção pelo CAV e o reovírus pode resultar em um quadro denominado “doença da asa azul”, ilustrando mais uma vez o caráter multifatorial das infecções pelos circovírus. Microscopicamente, pode-se observar depleção linfocitária no timo, na bursa de *Fabrycius* e no baço. Uma redução de células hematopoiéticas na medula, degeneração de hepatócitos e infiltração de macrófagos no fígado também podem ser observados.

Estudos recentes avaliaram a persistência do CAV nas gônadas de matrizes de corte que possuíam níveis variáveis de anticorpos neutralizantes e também a capacidade do vírus ser transmitido para a progênie. Foi observado que a transmissão do vírus ao embrião pode ocorrer independentemente dos altos níveis de anticorpos neutralizantes nas matrizes. Ainda não se tem estabelecido qual o título de anticorpos neutralizantes necessários para prevenir a transmissão vertical. Também é desconhecido se a vacinação das matrizes, que vem sendo realizada atualmente, é efetiva para proteger a progênie.

5.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da AIG deve ser realizado com base nas combinações entre os sinais clínicos, lesões macro e microscópicas e na detecção de antígenos ou ácidos nucleicos do CAV nos órgãos das aves afetadas. As técnicas de IHC, IFA e PCR são amplamente utilizadas para demonstrar a infecção pelo CAV. O isolamento viral não é um método recomendado para o diagnóstico, pois é demorado e caro. No entanto, o vírus replica em células MDCC-MSB1, que são células de linhagem de linfoma que se multiplicam em suspensão. O vírus também pode ser isolado pela inoculação de ovos embrionados. Anticorpos no soro podem ser detectados por imunofluorescência indireta, soroneutralização ou ELISA (testes comerciais já estão disponíveis).

5.2.4 Prevenção e controle

A infecção pelo CAV é muito comum em plantéis avícolas de todo o mundo. A prevenção da doença clínica pode ser obtida pela indução de títulos altos de anticorpos nas matrizes antes do início da idade de postura. Dessa forma, evita-se a transmissão vertical do CAV. Todavia, ainda não estão claros quais os níveis de anticorpos que são necessários para prevenir a transmissão vertical do vírus. Vacinas vivas atenuadas estão disponíveis no Brasil e são recomendadas em uma ou duas aplicações, entre as 16 e 20 semanas de idade, desde que os animais recebam a última dose pelo menos quatro semanas antes do início da postura.

Medidas como o controle de outros agentes imunossupressores e associados com infecções secundárias, limpeza e desinfecção das instalações também auxiliam a minimizar as perdas e a melhorar a biossegurança da granja.

6 Bibliografia consultada

- CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, v.169, p.326-336, 2005.
- BRENTANO, L. Anemia infecciosa das galinhas. In: BRECHIERI JR.; A. MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. Cap.5.9, p. 339-350.
- CIACCI-ZANELLA, J.,R.; MORES, N. Diagnostic of Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Swine in Brazil Caused by Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, MG, v. 55, p. 522-527, 2003.
- CROWTER, R.A. et al. Comparison of the structures of three circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *Journal of Virology*, v.77, p.13036-13041, 2003.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Pathogenesis of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome caused by Porcine Circovirus 2: an immune riddle. *Archives of Virology*, v.149, p.857-874, 2004.
- MADEC F. et al. La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) en France. 1. Aspects descriptifs, impact en élevage. *Journées de la Recherche Porcine en France*. v.31, p. 347-354, 1999.
- MANKERTS, A. et al. Molecular biology of Porcine circovirus: analysis of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.81-84, 2004.
- ROYER, R.L. Susceptibility of Porcine Circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health Production*, v.9, n.5, p. 281-284, 2001.
- LUKERT, P.D.; ALLAN, G.M. In: Straw, B.E. et al. Eds. *Diseases of swine*. 8.ed. Ames: Iowa State University Press, 2002. p.119-124.
- TISCHER, I. et al. Characterization of papovavirus and picornavirus like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakterio. Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig*, v.26, p.153-167, 1974.
- TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol*, v.29, p.373-394, 2000.
- TODD, D. et al. Genome sequence determinations and analysis of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology*, v.286, p.354-362, 2001.

1 Introdução	377
2 Classificação	377
3 Estrutura do vírion e do genoma	378
4 Replicação	381
4.1 O ciclo replicativo	381
5 Parvovírus de interesse veterinário	384
5.1 Vírus da panleucopenia felina	384
5.1.1 Epidemiologia	384
5.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	384
5.1.3 Diagnóstico	387
5.1.4 Controle e profilaxia	388
5.2 Parvovírus canino	388
5.2.1 Epidemiologia	388
5.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	389
5.2.3 Diagnóstico	391
5.2.4 Controle e profilaxia	391
5.3 Parvovírus suíno	392
5.3.1 Epidemiologia	392
5.3.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	393
5.3.3 Diagnóstico	394
5.3.4 Controle e profilaxia	395
5.4 Parvovírus bovino	395
6 Bibliografia consultada	395

1 Introdução

Os membros da família *Parvoviridae* são vírus pequenos, esféricos, com capsídeo icosaédrico, que possuem uma molécula de DNA linear de fita simples como genoma. O nome da família deriva do tamanho dos vírions (*parvus* = pequeno).

Uma característica marcante dos parvovírus é a dependência de células na fase S do ciclo celular ou em divisão, para a sua replicação. Essa dependência se deve ao requerimento da maquinaria celular para a síntese de DNA e replicação do genoma viral, devido ao número restrito de genes e funções codificadas pelo genoma do vírus. Os parvovírus possuem somente quatro genes, distribuídos em duas regiões codificantes (*open reading frames* – ORFs) sobrepostas no genoma DNA de fita simples de 5 quilobases (kb). Além disso, alguns vírus dessa família dependem de infecção conjunta com outros vírus (adenovírus ou herpesvírus) para completarem o seu ciclo replicativo. Esses vírus são agrupados no gênero *Dependovirus* e não há relatos de enfermidades animais associadas com esses agentes.

A dependência de células na fase S do ciclo celular exerce uma grande influência sobre a patogenia das infecções pelos parvovírus. As infecções por esses vírus afetam preferencialmente órgãos que apresentam células em multiplicação, como as células da medula óssea, células embrionárias e células precursoras do epitélio intestinal (células das criptas intestinais). Os parvovírus apresentam uma grande estabilidade no ambiente, podendo manter a sua infectividade durante meses, em determinadas condições, e são muito restritos quanto à espécie hospedeira.

Os primeiros relatos de enfermidades causadas por parvovírus em animais datam de mais de 100 anos e se referiam à panleucopenia felina (FPL). Posteriormente, foram descritos o vírus da enterite dos visons (MEV), em 1947, e o parvovírus canino (CPV) em 1978. As enfermidades causadas por esses três agentes são muito semelhantes e cursam com enterite e leucopenia. A infecção por esses agentes pode, ainda, estar associada com mortalidade e malformações fetais.

O parvovírus suíno (PPV) produz infecções subclínicas em animais jovens e adultos, porém é

responsável por perdas reprodutivas importantes quando infecta fêmeas prenhes. Outros parvovírus também são responsáveis por enfermidades em gansos, roedores e humanos. Existem também os parvovírus isolados em galinhas, coelhos e equinos, porém ainda não foram relatadas enfermidades associadas com esses agentes. O parvovírus bovino (BPV) encontra-se amplamente disseminado na população bovina, no entanto, a sua importância clínico-patológica é questionável. Além de sua importância como patógenos, vários parvovírus têm sido utilizados como vetores para a transferência de DNA em animais. Em geral, esses vetores podem carrear até 5 kb de DNA heterólogo, tendo como vantagem a ausência ou fraca resposta imune do animal contra o vetor, permitindo a sua ampla utilização.

2 Classificação

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), a família *Parvoviridae* é composta por duas subfamílias: *Parvovirinae* e *Densovirinae*. A primeira agrupa os parvovírus que infectam vertebrados e, por isso, os seus membros serão discutidos mais detalhadamente neste capítulo. A segunda contém vírus que infectam insetos e, aparentemente, não possuem importância em medicina veterinária. Os principais parvovírus de interesse veterinário estão listados na Tabela 14.1.

A subfamília *Parvovirinae* é dividida em cinco gêneros: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* (*ADMV-like viruses*) e *Bocavirus* (*BPV-like viruses*). O gênero *Erythrovirus* é representado pelo parvovírus humano, o B19, que causa abortos e doença exantematosa em crianças; e por outros vírus de primatas, como o parvovírus do macaco rhesus (RhPV) e o parvovírus símio (SPV).

A maioria dos gêneros abriga vírus que replicam de forma autônoma. Por outro lado, os *Dependovirus* são dependentes de adenovírus para replicar e, por isso, são chamados *adeno-associated virus* (AAV). Os AAV têm sido utilizados como vetores de expressão, por serem apatogênicos e por não induzirem resposta imune nos animais inoculados.

Tabela 14.1. Principais parvovírus animais, hospedeiros e manifestações clínicas

Gênero	Espécie	Abreviatura	Hospedeiros	Manifestações Clínicas
Parvovirus	Parvovírus de galinha	ChPV	galinhas	subclínica
	Vírus da panleucopenia felina	FPLV	gatos	panleucopenia, enterite, hipoplasia cerebelar
	Parvovírus canino	CPV	cães	leucopenia, miocardite, enterite
	Vírus da enterite das martas	MEV	martas (<i>M. vision</i>)	panleucopenia, enterite
	Parvovírus dos mãos-peladas	RPV	mão-pelada (<i>racoon</i>)	panleucopenia, enterite
	Vírus minuto dos camundongos	MMV ou MVM	camundongos	deformidades congênitas
Dependovirus	Parvovírus suíno	PPV	suínos	infertilidade, aborto, mumificação fetal
	Parvovírus de gansos	GPV	gansos	hepatite, miocardite
	Parvovírus de patos <i>Muscovy</i>	MDPV	patos	hepatite, miocardite
	Vírus adeno-associados	AAV-1 a 6	várias espécies	subclínica
Bocavirus	Parvovírus bovino	BPV	bovinos	subclínica
	Vírus minuto canino	CnMV	cães	diarréia
Amdovirus	<i>Aleutian mink disease virus</i>	AMDV	martas (<i>M. Vision</i>)	encefalopatia

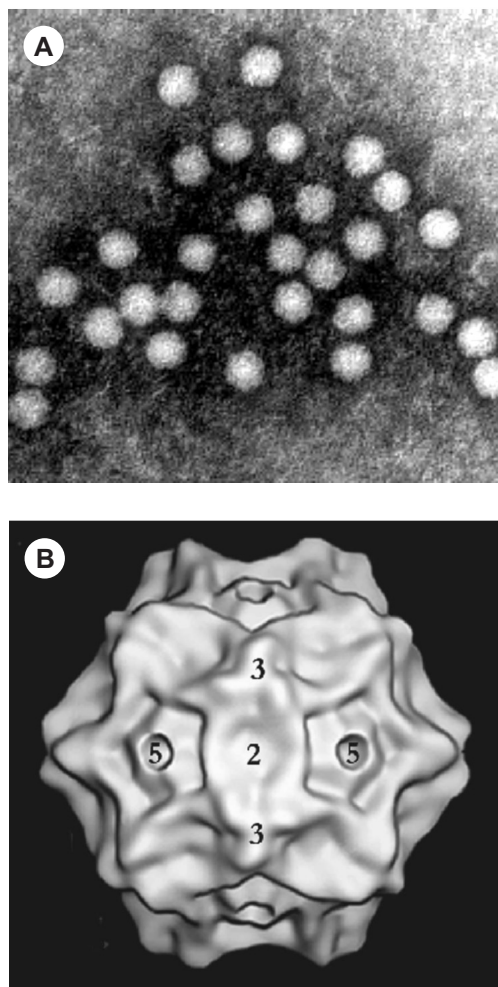
No gênero *Parvovirus*, são classificados os agentes associados com doenças em animais, como o vírus da panleucopenia felina (FPLV), o CPV e o parvovírus suíno (PPV). Originalmente, era reconhecido apenas um parvovírus de cães, o *canine minute virus* (CnMV), que pertence ao gênero *Bocavirus* e possui ocorrência esporádica. Na década de 1970, surgiu outro parvovírus nesta espécie, denominado parvovírus canino tipo 2 (CPV-2). Este vírus, denominado genericamente de CPV, originou-se a partir do FPLV, disseminou-se rapidamente na população canina e, atualmente, constitui-se em um dos principais patógenos da espécie canina.

Tem sido proposto que o grupo do FPLV, que inclui o CPV, o parvovírus das martas (MEV) e da mão-pelada ou *racoon* (RPV), constitui-se, na verdade, em uma espécie viral, e que os vírus individuais seriam subespécies. Neste caso, o CPV seria, na verdade, uma subespécie do FPLV. De fato, existem evidências biológicas (como a repli-

cação em células de origem felina), sorológicas e filogenéticas de que o CPV realmente deriva do FPLV. A diferença entre os vírus felino e canino parece estar restrita à substituição de dois aminoácidos em uma proteína do capsídeo, responsável pela interação dos vírions com os receptores das células hospedeiras.

3 Estrutura do vírion e do genoma

Os vírions dos parvovírus são pequenos (18 a 26 nm de diâmetro), aproximadamente esféricos, com simetria icosaédrica e são desprovidos de envelope (Figura 14.1). As partículas virais possuem uma massa de 5,5 a 6,2 x 10⁶ daltons, distribuídas em uma porção protéica (80%) e DNA (20%). A densidade situa-se entre 1,39 e 1,42 g/cm³ em gradiente de cloreto de cério, o que permite a separação dos *Dependovirus* dos vírus associados, como os adenovírus.



Fonte: A) web.uct.ac.za; B) Muzyczka e Berns (2001).

Figura 14.1 Vírions da família *Parvoviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica de partículas víricas; B) Reconstrução de crio-eletromicroscopia, com indicação das estruturas na superfície do vírion. Depressões, chamadas de dimples (2); projeções ou spikes (3) e cilindros (5). As depressões que circundam os cilindros são conhecidas como canyons.

Os vírions apresentam uma grande resistência à inativação no meio ambiente, que pode ser creditada à sua estrutura simples e compacta, desprovida de envelope. A estrutura vírica é estável sob pH entre 3 e 9, e a temperatura de 56°C por 60 minutos. Por outro lado, a infectividade pode ser inativada com desinfetantes à base de formalina, hipoclorito de sódio e agentes oxidantes. Outra característica dos parvovírus é a capacidade de aglutinar eritrócitos de suínos, de cobaias e/ou de macacos rhesus, dependendo da

espécie do vírus. A maioria dos parvovírus possui uma gama de hospedeiros e tropismo muito restritos. No entanto, alguns vírus podem sofrer mutações e ampliar a sua gama de hospedeiros. Um exemplo foi a substituição de dois aminoácidos na proteína VP2 do FPLV, que permitiu ao vírus utilizar o receptor da transferrina (TfR) presente em células de cães e, assim, estabelecer o CPV como um novo patógeno canino.

As partículas virais são formadas por três classes de proteínas: VP1, VP2 e VP3, com exceção do AMDV (vírus da doença das martas Aleutian), que possui apenas as duas primeiras. A massa molecular das proteínas varia entre 80 e 86 kDa (VP1), 64-75 kDa (VP2) e 60-62 kDa (VP3). Essas proteínas são codificadas a partir de uma única ORF no genoma viral, sendo a VP1 e VP2 originadas por *splicing* alternativo do RNA mensageiro (mRNA). A VP3 é formada a partir da clivagem de 15 a 20 aminoácidos da região amino-terminal da VP2. A VP3 somente é detectada em partículas inteiras, ou seja, em partículas que contêm o genoma viral completo, pois há produção de grande quantidade de partículas defeitivas que apresentam genomas incompletos ou ausentes.

O capsídeo é formado por 60 cópias da VP2 e poucas cópias da VP1 e da VP3. Quando observada por cristalografia, a proteína VP2 apresenta oito cadeias estruturais em forma de barril- β , estrutura que é conservada em outros vírus icosaédricos. Essas estruturas são ligadas por alças que estão expostas na superfície do vírion e são responsáveis pela estabilidade das partículas no ambiente. A VP2 possui ainda epitopos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes juntamente com a VP3, e pequenas diferenças nesta proteína podem determinar o tropismo por diferentes tecidos e hospedeiros.

Na superfície dos vírions, podem ser observadas estruturas características, como protuberâncias (*spikes*), depressões (*dimples*) e estruturas na forma de cilindros circundados por depressões (*canyons*) (Figura 14.1). Essas estruturas possuem funções biológicas importantes, como o reconhecimento e ligação a receptores celulares (depressões) e determinação das características imunogênicas (projeções).

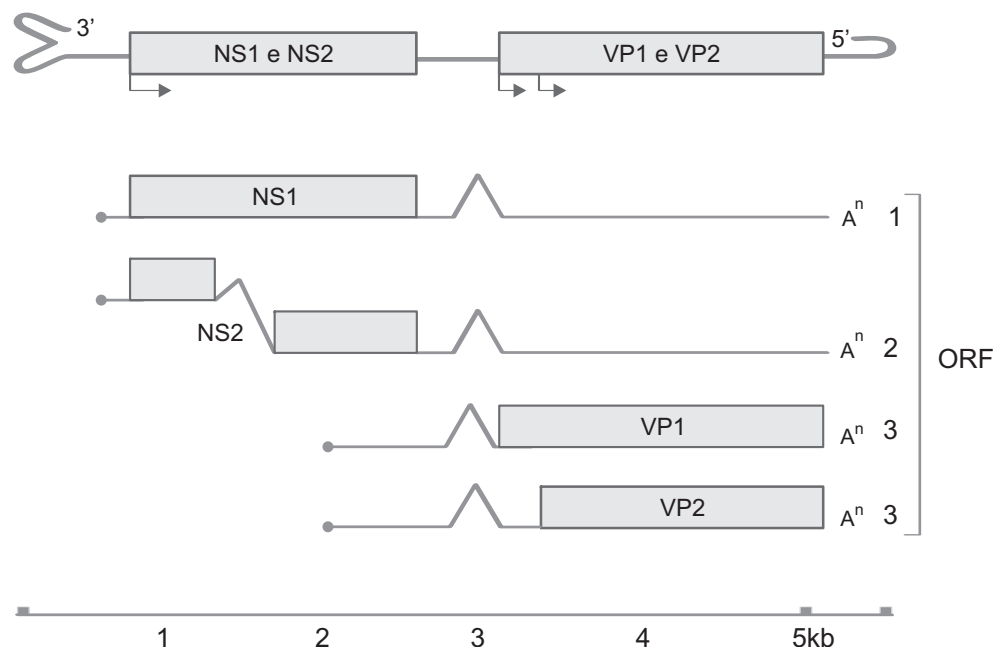
O genoma dos parvovírus é composto por uma molécula de DNA linear de cadeia simples, com aproximadamente 5 kb. Os *Dependovirus* apresentam um genoma de 4.5 kb. Em geral, a molécula de DNA que é incorporada aos vírions é de polaridade negativa (complementar aos mRNAs), mas alguns parvovírus podem encapsidar qualquer uma das cadeias em proporções variadas. Os vírions do BPV, por exemplo, apresentam moléculas de DNA de polaridade positiva em aproximadamente 20 a 30% das partículas.

O genoma dos parvovírus de importância veterinária possuem apenas duas ORFs, que codificam quatro proteínas: duas proteínas não-estruturais (NS1 e NS2) e duas ou três proteínas estruturais (VP1 e VP2/VP3) (Figura 14.2).

As proteínas não-estruturais (NS1 e NS2) são produzidas pela tradução de mRNAs que sofrem *splicing* alternativo. A NS1 é essencial para

a replicação do genoma viral, e a NS2 está associada com a formação dos capsídeos, controle da expressão gênica e também participa da replicação do genoma. As proteínas produzidas a partir da outra ORF (VP1 e VP2) fazem parte da estrutura do capsídeo. As proteínas VP1 e VP2 são traduzidas a partir de um mesmo mRNA, após *splicing*, e compartilham a maior parte de sua sequência de aminoácidos. A diferença entre a VP1 e VP2 resulta da utilização de diferentes códons de iniciação pelos ribossomos. A VP3 é composta por uma sequência de aminoácidos da região amino-terminal da VP2. Os mRNAs, produzidos pela transcrição do genoma, possuem 5' *cap* e são poliadenilados na extremidade 3'.

O genoma viral apresenta de 6 a 10 sequências palindrômicas, que possibilitam a formação de estruturas em forma de grampo nas regiões terminais (Figura 14.2). Essas estruturas são es-



Fonte: adaptado de Murphy et al. (1999).

Figura 14.2 Ilustração esquemática da estrutura e organização do genoma e dos transcritos do parvovírus canino (CPV). A figura superior representa o DNA genômico com as extremidades 5' e 3' flexionadas sobre si; a localização das duas ORFs e os sítios de iniciação da transcrição (setas). A figura inferior mostra os três transcritos (1, 2 e 3), com as respectivas ORFs e locais de processamento. As linhas contínuas representam a cadeia de RNA, e os retângulos representam as ORFs codificantes das respectivas proteínas. NS1 e NS2: proteínas não-estruturais; VP1 e VP2: proteínas do capsídeo.

senciais para a replicação do genoma viral e para a encapsidação do genoma na progênie viral.

4 Replicação

A replicação dos parvovírus autônomos ocorre no núcleo das células hospedeiras e depende de fatores celulares que estão presentes somente quando a célula está em fase S ou G2. Algumas características da patogenia das infecções por parvovírus dependem das células em mitose. Por exemplo, a infecção de fetos (parvovírus suíno e felino) ou de animais recém-nascidos (CPV) é favorecida pela presença de um grande número de células em divisão. A infecção pode ser sistêmica em fetos e em animais recém-nascidos, mas é geralmente restrita a tecidos com células em mitose, como o epitélio intestinal, em animais com mais idade.

Em fetos felinos ou em gatos recém-nascidos, a infecção afeta o cerebelo; enquanto em cães com até seis semanas de idade, o miocárdio é o sítio preferencial de infecção pelos parvovírus. Em animais mais velhos, as células que se encontram em divisão são, principalmente, as células linfóides e as células das criptas do intestino. A replicação do parvovírus nessas células pode produzir linfopenia ou enterite, respectivamente.

Usualmente, a replicação dos parvovírus *in vitro* é restrita a células da espécie hospedeira, como as PK-15 (rim de suíno) para o PPV; CRFK (rim de gato) para o FPLV. O CPV constitui-se em exceção, pois replica em células MDCK (rim de cão – o hospedeiro) e pode multiplicar-se também em células da linhagem CRFK.

A determinação do tropismo celular ou tecidual do vírus depende de seqüências específicas de aminoácidos na superfície dos vírions, importantes para o reconhecimento e ligação aos receptores celulares. No CPV, o tropismo é determinado por três aminoácidos da VP2 (posições 93, 300 e 323). O tropismo de cepas não-patogênicas do PPV, como a NADL-2, e patogênicas, como a *Kresse*, é determinado por diferenças em um aminoácido na projeção da VP2 (posição 436), e em dois aminoácidos que circundam a depressão.

4.1 O ciclo replicativo

O ciclo replicativo dos parvovírus inicia-se pelo reconhecimento e ligação dos vírions a receptores celulares. O receptor utilizado pelo FPLV e CPV provavelmente seja o TfR, que é expresso preferencialmente em células em divisão, que são dependentes de transferrina para realizarem a sua multiplicação. O BPV e alguns AAVs utilizam sialoglicoproteínas como receptores, ligando-se ao componente ácido siálico. O parvovírus humano B19 liga-se a carboidratos; e o AAV-2 utiliza o sulfato de heparina ou uma integrina como receptor.

A penetração ocorre pela via endocítica, e os vírions são transportados rapidamente até as proximidades do núcleo da célula. Durante esse trajeto, as partículas virais são expostas a pH progressivamente mais baixo no interior dos endossomos, o que induz alterações na conformação das proteínas do capsídeo.

No interior dos endossomos, as partículas virais sofrem três alterações importantes: exposição da região amino-terminal da VP1, clivagem da região amino-terminal da VP2 e, finalmente, o desnudamento do genoma. Essas alterações ocorrem simultaneamente e podem ser detectadas aos 30 minutos após a internalização dos vírions. As partículas que permanecem nessas vesículas até a fusão com os lisossomos são degradadas. A região amino-terminal da VP1 possui sinais de localização nuclear, promovendo a sinalização para o transporte do complexo nucleoproteína (DNA + proteínas) para o núcleo da célula.

No núcleo, a primeira etapa da replicação é a síntese da fita de DNA complementar ao genoma viral, resultando em uma molécula de DNA de fita dupla (Figura 14.3). Essa síntese é realizada por DNA polimerases celulares e fatores auxiliares, também de origem celular. A abundância da DNA polimerase e de nucleotídeos é a principal razão da dependência dos parvovírus por células em multiplicação. A molécula de DNA de fita dupla produzida pode, então, ser utilizada como molde pela RNA polimerase II celular para a transcrição e conseqüente produção dos mRNAs.

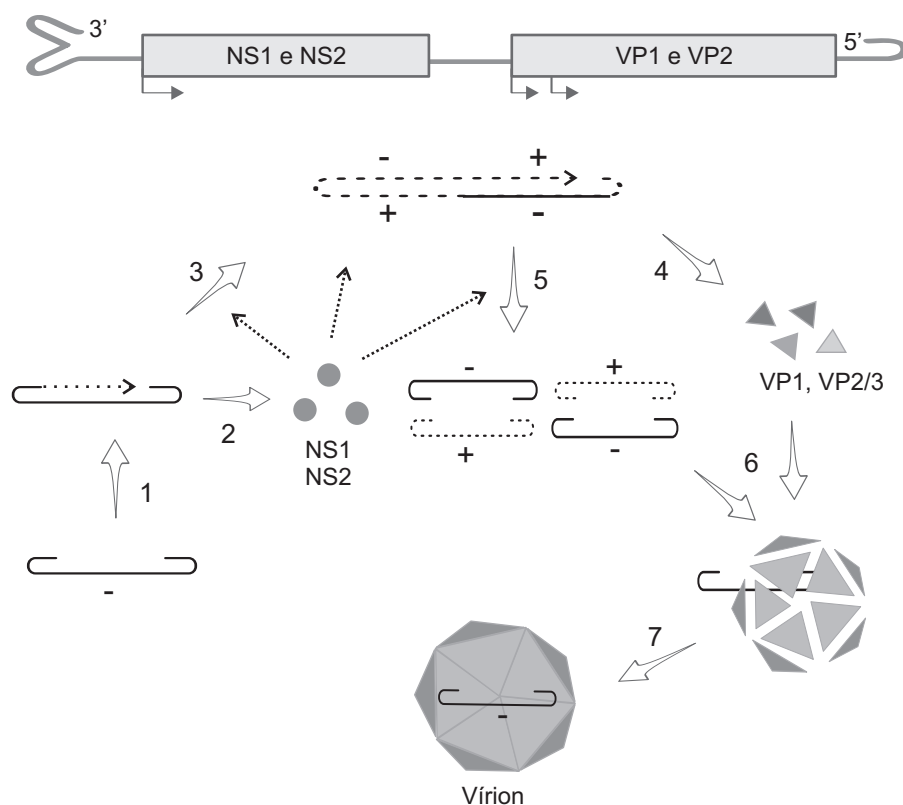


Figura 14.3. Etapas da expressão gênica e replicação dos parvovírus autônomos. O genoma DNA de fita simples (ssDNA) é, inicialmente, convertido em DNA de fita dupla (dsDNA) por enzimas celulares (1), seguido da expressão (transcrição, tradução) das proteínas NS1 e NS2 (2). A proteína NS1 é essencial nas etapas seguintes da replicação do genoma (3), para a expressão das proteínas estruturais (4) e também na fase final da replicação do DNA (5). Os genomas recém-replicados são encapsidados pelas proteínas estruturais VP1 e VP2/3, originando as novas partículas víricas (6,7).

Apesar da variação entre a posição específica de cada elemento, três transcritos são produzidos durante a replicação dos parvovírus autônomos. A sua produção é dependente de promotores distribuídos ao longo do genoma viral. Em contraste, existe apenas um sinal para a poliadenilação desses transcritos, que está localizado na região terminal do genoma. Os mRNAs originados por *splicing* dos transcritos R1 e R2 serão traduzidos nas proteínas não-estruturais NS1 e NS2, respectivamente. O outro transcrito primário (R3) é o responsável pela codificação das proteínas VP1 e VP2/VP3. Estes transcritos também são submetidos a processamento por *splicing*. A utilização de um determinado códon para início da tradução resulta na produção da VP1; a utilização de um códon mais adiante resulta na síntese da

VP2. Além desses, já foram detectados outros seis transcritos, que são produzidos de forma estável em células infectadas, mas a sua função ainda não foi estabelecida.

A expressão gênica dos parvovírus é regulada de forma que a produção da proteína NS1 ocorra somente na fase S do ciclo celular. Na região anterior ao sinal de transcrição deste gene, existe uma sequência específica de nucleotídeos que é reconhecida pelo fator de transcrição celular Sp1. No entanto, somente a presença deste elemento não explica a regulação da expressão gênica. Essa regulação é fundamental para o sucesso da infecção pelos parvovírus, pois a produção da NS1 de forma contínua é tóxica para a célula. No entanto, o acúmulo da proteína NS1 durante a fase S é necessário para a ativação dos genes que

codificam as proteínas estruturais. Essa função é realizada pela ligação da NS1 a fatores de transcrição celulares, alguns deles já descritos (TBP e TFIIA). A proteína NS1 também é essencial para a replicação do genoma viral, atuando em diferentes etapas do processo. Entre outras funções, a NS1 participa da replicação através de suas funções helicase e endonuclease. Esta última função está relacionada com a maturação do DNA viral e com a interferência com a replicação do DNA celular. A fosforilação da NS1 é necessária para que suas funções sejam exercidas de forma plena.

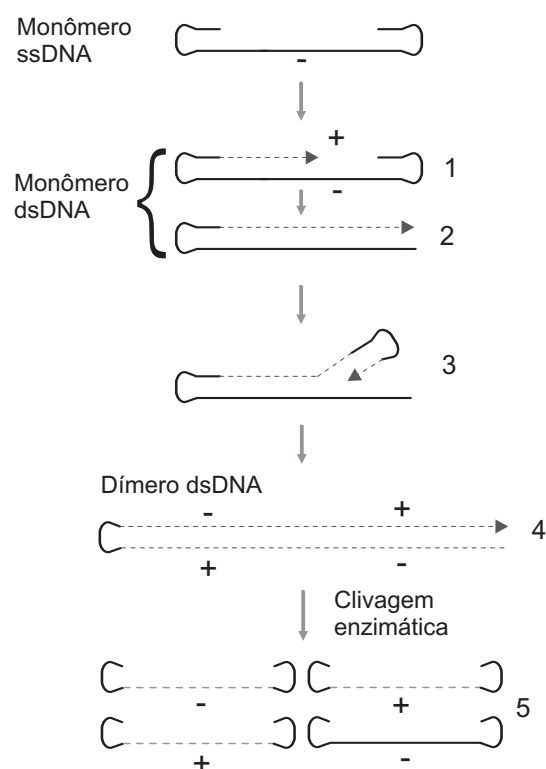
As etapas seguintes do ciclo envolvem a expressão das proteínas estruturais (VP1, VP2/3), a complementação da replicação do genoma e, finalmente, a morfogênese das partículas víricas, pela interação das proteínas do capsídeo com monômeros de DNA (Figura 14.3).

Vários grupos têm estudado com detalhes os mecanismos de replicação do genoma dos parvovírus. O conhecimento adquirido é importante para o desenvolvimento de vetores baseados em parvovírus dependentes (principalmente os AVV) e também para a produção de vacinas. O modelo de replicação mais aceito é o de produção de cópias genômicas por um mecanismo de círculo rolante modificado. Neste modelo, as sequências palindrômicas repetidas da região terminal 3' do genoma serviriam como iniciadores para a síntese da cadeia complementar, ao formar estruturas terminais semelhantes a grampos de cabelo (*hairpins*). Esse processo ocorreria no início do ciclo replicativo, logo após o ingresso do DNA no núcleo celular, resultando na síntese de cadeias de DNA complementares, que seriam utilizadas como molde para a transcrição (Figura 14.4).

Com a produção das proteínas não-estruturais NS1 e NS2 e uma vez completada a primeira cadeia de DNA fita dupla, a polimerização continuaria, produzindo uma cópia linear dupla que corresponderia a quatro cópias do genoma viral (duas de polaridade positiva, duas negativas). Essa estrutura tetrâmera pode não ser a única produzida, e alguns pesquisadores acreditam que estruturas maiores, contendo um número maior de cópias do genoma, podem ser também produzidas. Essa macromolécula composta por múltiplas cópias do genoma seria, então, resol-

vida pela atividade endonuclease da NS1, que clivaria o multímero em unidades genômicas de polaridade positiva e negativa (Figura 14.4). Em geral, as moléculas de DNA de polaridade negativa são preferencialmente encapsidadas. No entanto, algumas espécies virais podem encapsidar uma mistura das duas ou também uma proporção variável de DNAs de polaridade positiva/negativa.

A maturação dos vírions ocorre no núcleo e leva aproximadamente 60 minutos para ser com-



Fonte: adaptado de Murphy et al. (1999).

Figura 14.4 Ilustração simplificada da replicação do genoma dos parvovírus. A replicação se inicia na extremidade 3' livre e prossegue ao longo do genoma (1), resultando inicialmente na formação de um monômero de DNA de fita dupla (dsDNA) (2). O prosseguimento da polimerização (3) leva à formação de uma molécula dimérica de dsDNA, que contém quatro moléculas com a extensão genômica (4). A clivagem deste multímero resulta em quatro moléculas genômicas de ssDNA, sendo duas de sentido positivo e duas de sentido negativo (5). Acredita-se que multímeros contendo um número maior de unidades genômicas possam ser formados durante a replicação do genoma dos parvovírus.

pletada, no entanto, a produção de capsídeos vazios pode ocorrer em menos tempo. Os capsídeos vazios apresentam uma conformação diferente das partículas virais completas. O processo de replicação dos parvovírus produz corpúsculos de inclusão intranucleares grandes. A liberação dos vírions ocorre por lise das células infectadas.

5 Parvovírus de interesse veterinário

Os parvovírus que possuem importância como patógenos de animais de produção e companhia pertencem à subfamília *Parvovirinae*. Neste capítulo, serão abordados o vírus da panleucopenia felina (FPLV), o parvovírus canino (CPV), o parvovírus suíno (PPV) e o parvovírus bovino (BPV), pela sua importância clínico-patológica e sanitária nas respectivas espécies.

5.1 Vírus da panleucopenia felina

A panleucopenia felina (FPL) é uma doença infecciosa de distribuição mundial, que afeta os felídeos domésticos e selvagens, e também outras espécies (visons e guaxinins). A FPL é uma das principais doenças virais de felinos e encontra-se controlada nas comunidades onde a vacinação é realizada de forma rotineira. Entretanto, a doença clínica em sua forma mais grave ainda é frequentemente observada em gatos não-vacinados, geralmente provenientes de gatis. Nesses animais, as taxas de morbidade e mortalidade são elevadas.

A panleucopenia felina é causada pelo FPLV, um vírus muito semelhante ao CPV. Nos últimos anos, foram isoladas as cepas *a* e *b* do CPV de gatos saudáveis e também de gatos com sinais clínicos de FPL. Da mesma forma, diferentes cepas de CPV foram capazes de reproduzir uma doença compatível com a FPL em gatos inoculados experimentalmente. É possível que o FPLV e o CPV apresentem transmissão mútua entre as espécies felina e canina e, eventualmente, alguns desses animais desenvolvam a doença clínica.

Os vírions do FPLV são muito resistentes sob condições ambientais, sendo capazes de manter a viabilidade por até um ano sob temperatura

ambiente. O vírus resiste a vários desinfetantes, porém é inativado pelo hipoclorito de sódio a 6%, formol a 4% e glutaraldeído a 1% quando exposto por 10 minutos.

5.1.1 Epidemiologia

O FPLV pode causar doença em todos os membros da família dos felídeos. O vírus possui distribuição mundial pela sua natureza altamente contagiosa e pela alta capacidade de persistir no meio ambiente. Cerca de 75% dos gatos com um ano de idade, não-vacinados e clinicamente saudáveis, apresentam anticorpos contra o FPLV. Portanto, a maioria dos gatos susceptíveis é exposta e infectada pelo vírus durante seu primeiro ano de vida. Nesses animais, a infecção é geralmente subclínica.

A doença com sinais clínicos típicos ocorre mais frequentemente nos animais jovens não vacinados, embora os filhotes vacinados também possam desenvolver a enfermidade. Isso ocorre pela interferência da imunidade materna com a resposta vacinal. Na verdade, existe uma relação inversa entre a incidência da doença e a idade dos animais, ou seja, a incidência da enfermidade diminui à medida que a faixa etária aumenta.

A transmissão do vírus ocorre pelo contato direto ou indireto dos animais susceptíveis com os animais infectados ou com as suas secreções. O vírus pode estar presente em todas as secreções corpóreas de gatos infectados, porém é mais consistentemente encontrado nas fezes diarreicas. A rota fecal-oral é considerada a principal forma de transmissão. Pela alta resistência do FPLV no ambiente, a transmissão por fômites contaminados pode desempenhar um importante papel na propagação da infecção.

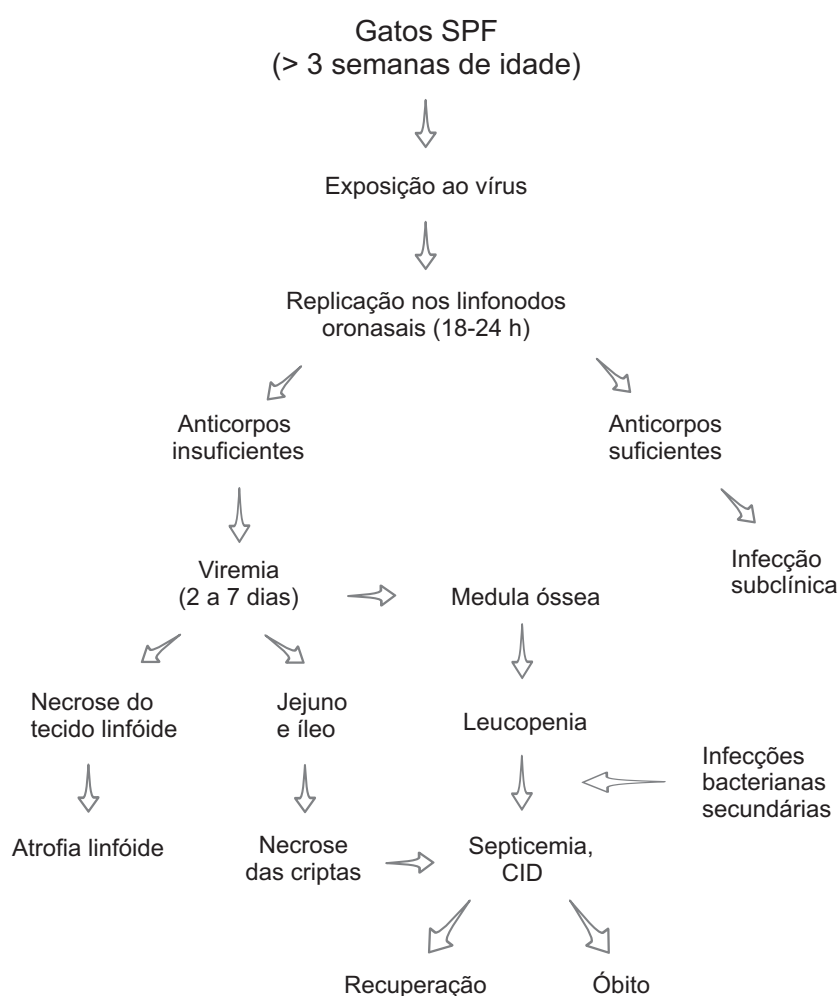
5.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a exposição oronasal, o vírus se multiplica inicialmente nos linfonodos regionais. Após a replicação primária, o vírus atinge a corrente sanguínea e dissemina-se para os tecidos que possuem células em divisão, como a medula óssea, epitélio das criptas intestinais e órgãos linfóides

(Figura 14.5). O tropismo do vírus pelas células hematopoiéticas explica um dos eventos característicos da doença, a panleucopenia. Da mesma forma, a replicação viral no epitélio intestinal é responsável pelo quadro de enterite. Quando a infecção ocorre no terço final da gestação ou no neonato, além do tecido linfóide e medula óssea, o sistema nervoso, incluindo o cérebro, cerebelo, nervo óptico e também a retina, podem ser infectados.

As infecções experimentais de gatos SPF (livres de patógenos específicos) têm demonstrado quadros mais brandos do que aqueles observados em infecções naturais. Isso sugere que outros fatores podem participar no agravamento da doença. Acredita-se que os animais SPF apresentem uma

taxa menor de renovação das células linfóides e intestinais do que os animais com microflora intestinal preservada. Na ausência de patógenos, a renovação celular seria menor, com isso, a replicação viral e a destruição celular seriam reduzidas, resultando em doença de severidade moderada. As infecções bacterianas secundárias pela microflora intestinal parecem contribuir para o agravamento da doença. A endotoxemia resultante da absorção de toxinas das bactérias gram-negativas intestinais, acompanhada ou não de bacteremia, e o desenvolvimento da coagulação intravascular disseminada (CID) são complicações comuns da FPL e, provavelmente, responsáveis pela evolução fatal da doença (Figura 14.5).



Fonte: adaptado de Greene (1998).

Figura 14.5 Patogênese da panleucopenia felina. CID: coagulação intravascular disseminada.

Durante a infecção intestinal, a replicação do FPLV destrói as células das criptas do epitélio. Essas células normalmente se diferenciam em células de absorção à medida que migram para o ápice das vilosidades. A consequência imediata desta destruição celular é atrofia das vilosidades, pela perda e não reposição das células epiteliais, e o consequente colapso dos vilos com exposição da lâmina própria da mucosa. A diarreia resultante é devida à deficiência de absorção e aumento da permeabilidade. A diarreia é freqüentemente hemorrágica pelo sangramento de capilares a partir da destruição do revestimento epitelial da mucosa. Esse sangramento também resulta em perda de proteínas para a luz intestinal. A consequência final das lesões provocadas pelo vírus é a quebra da barreira de proteção intestinal e a translocação de bactérias, que atingem a circulação sangüínea e sítios extra-intestinais, podendo ocorrer septicemia e CID. A isquemia intestinal ocorre devido à hipovolemia, pelas perdas líquidas por vômito e diarreia; e pode ser agravada pela septicemia, causando o choque séptico. Pode também ocorrer uma resposta inflamatória sistêmica e falência múltipla de órgãos.

A replicação viral provoca também lise de linfócitos, resultando em depleção marcante dos folículos linfóides dos linfonodos, baço, tecido linfóide intestinal e timo. A atrofia dos tecidos

linfóides foi associada à capacidade do FPLV de induzir apoptose em células linfóides felinas. Foi demonstrado *in vitro* que o FPLV pode provocar lise de células das linhagens eritróide e mielóide. É possível que essa lise ocorra também *in vivo* e seja responsável pela leucopenia intensa.

A infecção intra-uterina pelo FPLV, no início da gestação, pode resultar em morte e reabsorção dos embriões ou fetos, infertilidade, abortos ou no nascimento de fetos mumificados (Figura 14.6). A infecção no terço final da gestação irá resultar no nascimento de filhotes vivos com graus variáveis de deficiências neurológicas. Em uma mesma ninhada, podem estar presentes animais com diferentes graus de deficiência e mesmo animais sem alterações aparentes, devido à aquisição de imunidade. O cerebelo é a área mais afetada, pois parte do desenvolvimento deste órgão em gatos ocorre na fase final da gestação e no período neonatal. Os filhotes infectados nessa fase apresentam hipoplasia cerebelar e aqueles que sobrevivem apresentam sinais permanentes de doença cerebelar.

Uma grande parcela dos gatos infectados parece não manifestar sinais clínicos da infecção. A doença, com os sinais clássicos, é observada, principalmente, em animais jovens e sem histórico de vacinação, embora animais mais velhos e mesmo vacinados possam desenvolver a en-

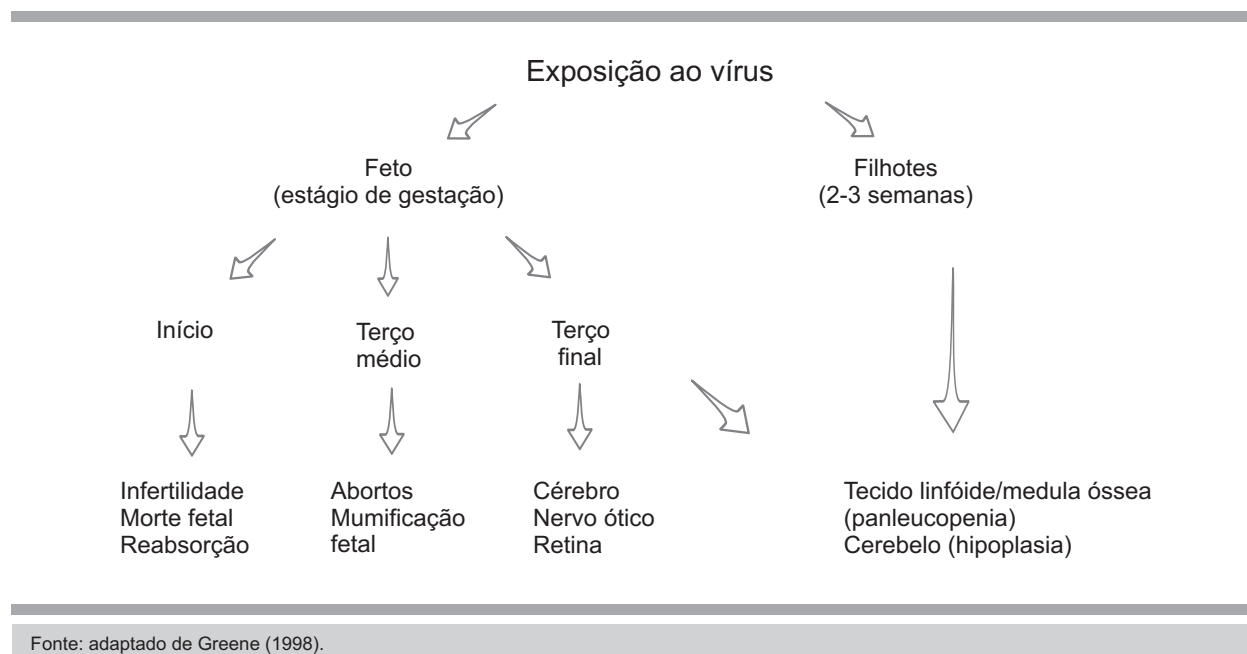


Figura 14.6 Patogenia da panleucopenia felina após infecção fetal e neonatal.

fermidade. A faixa etária de maior incidência da doença situa-se entre os três e cinco meses. A taxa de letalidade em animais com menos de um ano de idade varia de 50 a 90%.

Os sinais clínicos iniciais da doença, com evolução de três a quatro dias, incluem depressão profunda, anorexia, hipertermia (40°C), vômito e desidratação. A diarreia, com ou sem hemorragia, pode ocorrer em uma fase mais tardia. Muitas vezes os gatinhos podem morrer antes de apresentarem diarreia hemorrágica. Quando submetidos à palpação abdominal, os animais podem demonstrar dor abdominal, alças intestinais espessadas e ruídos intestinais. Petéquias e equimoses podem ser observadas em animais que desenvolvem CID. Em estágios terminais, podem ser observadas hipotermia, estupor e coma. Animais que sobrevivem por mais de cinco dias geralmente evoluem para a recuperação clínica.

Os gatinhos que adquirem a infecção no final da gestação ou logo após o nascimento podem apresentar apenas o quadro neurológico. Os sinais típicos de lesão cerebelar, como ataxia, hipermetria, tremor, estacação em base larga (membros afastados) e quedas pela incoordenação dos membros e tronco, são observados após três ou quatro semanas de vida. A intensidade dos sinais pode variar entre filhotes da mesma ninhada. As anormalidades neurológicas não são progressivas, porém são permanentes. Os animais com sinais brandos podem se adaptar à sua deficiência e viver normalmente, apesar dos seus *deficits* neurológicos. O exame de fundo de olho pode revelar áreas de degeneração da retina, que aparecem como pequenos focos acinzentados com bordas escurecidas.

O principal achado laboratorial é a panleucopenia, observada em 100% dos casos de doença sistêmica. A panleucopenia pode ser detectada a partir do segundo dia da infecção, podendo atingir números extremamente baixos (200 leucócitos/dl) entre o quarto e o sexto dia. Quanto mais intensa for a leucopenia, mais desfavorável será o prognóstico. Anemia e trombocitopenia também ocorrem. Outros achados laboratoriais, como hiperbilirrubinemia e aumento das enzimas hepáticas, podem eventualmente ser detectados.

Os achados patológicos incluem congestão e redução da espessura do intestino delgado, áreas de necrose, vilosidades atrofiadas, muco e debris celulares. Inclusões intranucleares podem ser encontradas nas células das criptas intestinais. Os linfonodos podem estar aumentados de volume, edematosos, com destruição de linfócitos e infiltração massiva de neutrófilos. Nos fetos e filhotes com sinais neurológicos, são observadas lesões na lâmina granular externa do cerebelo, além de hipoplasia cerebelar.

5.1.3 Diagnóstico

O achado de intensa leucopenia em gatos com histórico e sinais clínicos compatíveis com a FPL é suficiente para se estabelecer um diagnóstico presuntivo. Entretanto, o diagnóstico definitivo depende da realização de outros testes, como a microscopia eletrônica (ME) das fezes, isolamento viral, sorologia e imunofluorescência (IFA). Nos casos fatais, as alterações histopatológicas intestinais são consideradas patognomônicas.

Podem ser realizados testes de hemaglutinação (HA) a partir de amostras fecais, uma vez que o FPLV aglutina eritrócitos de suínos. O isolamento viral em cultivo celular também pode ser utilizado para a confirmação da etiologia. Nesse caso, células primárias felinas ou células de linhagem de origem felina, como a CRFK, podem ser utilizadas.

Testes comerciais de ELISA para a detecção de antígenos virais nas fezes estão disponíveis no comércio. Pode-se também realizar a técnica de IFA em tecidos para a detecção de antígenos virais. Outro recurso diagnóstico é a técnica de PCR, para a identificação de DNA viral em tecidos, fezes ou em células infectadas.

A pesquisa de anticorpos pode ser realizada por soroneutralização (SN), imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA, porém os resultados devem ser interpretados com cautela, em razão da grande disseminação da infecção. Nesse sentido, somente a sorologia pareada ou a detecção de IgM são indicativos de infecção recente. A técnica de inibição da hemaglutinação (HI) também

pode ser utilizada para titular amostras únicas ou pareadas.

5.1.4 Controle e profilaxia

O tratamento da FPL é tipicamente de suporte, pois não existem drogas antivirais específicas. Após aproximadamente cinco dias da infecção, os animais desenvolvem mecanismos imunológicos adequados para controlar a infecção. Os objetivos principais da terapia incluem a manutenção do equilíbrio hídrico e eletrolítico, a redução das perdas líquidas por vômito e diarreia e o combate às infecções bacterianas secundárias.

A vacinação se constitui em um método eficiente para proteger os animais e reduzir a incidência da FPL. Para isso, existem vacinas inativadas e com vírus vivo modificado. Estas últimas produzem imunidade mais rápida e efetiva do que as vacinas inativadas. A primeira vacinação deve ser realizada com seis a oito semanas de idade e repetida com intervalos de quatro semanas. Recomenda-se a revacinação anual, porém acredita-se que as vacinas atenuadas possam produzir imunidade duradoura, e as possíveis exposições naturais permitiriam a manutenção de títulos adequados de anticorpos por toda a vida do animal. Em animais vacinados adequadamente quando jovens, uma revacinação a cada três anos pode oferecer uma segurança adicional.

5.2 Parvovírus canino

A parvovirose canina é considerada uma das principais causas de diarreia de origem infecciosa em cães com idade inferior a seis meses. A doença é causada pelo parvovírus canino (*canine parvovirus*, CPV) que surgiu no final dos anos 1970 e disseminou-se rapidamente por todos os continentes. A incidência da infecção é elevada em todo o mundo. A parvovirose canina caracteriza-se por enterite grave, com anorexia, vômitos, diarreia hemorrágica e choque. O CPV deve ser diferenciado do outro parvovírus que infecta cães, o *canine minute virus* (CnMV), que foi descrito em 1970, possui ocorrência pouco freqüente e é considerado pouco patogênico.

Após o seu surgimento a partir do FPLV, o CPV continuou sofrendo alterações genéticas, dando origem a novas cepas, designadas como subtipos CPV-2a e CPV-2b. Felizmente, as diferenças antigênicas entre essas cepas são mínimas e as vacinas protegem contra ambas. Um terceiro subtipo tem sido proposto, o CPV-2c. O CPV-2b é amplamente difundido nos Estados Unidos, enquanto na Europa encontram-se tanto o CPV-2b como o CPV-2a. No Brasil, existem relatos da circulação de ambos os subtipos. O CPV-2a predominou na década de 1980, porém entre 1990 e 1995 a infecção pelo CPV-2b ocorreu com maior freqüência.

Assim como os demais parvovírus, o CPV é muito resistente no ambiente e à maioria dos desinfetantes. Uma das exceções é o hipoclorito de sódio, comercializado como água sanitária, em concentrações que variam de 2 a 3%. O hipoclorito de sódio a 0,175% é efetivo para a inativação do CPV. Para assegurar a ação do produto, a solução deve permanecer em contato com o agente por tempo prolongado (horas).

5.2.1 Epidemiologia

A parvovirose canina surgiu no final dos anos 1970, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade. A gravidade da doença observada nessa época foi atribuída à falta de imunidade natural da população canina contra o novo vírus. Atualmente, os cães são mais resistentes ao CPV, provavelmente pelas vacinações e pela resistência natural contra a doença. Entretanto, a incidência da infecção se mantém alta em animais com idade entre seis semanas e seis meses.

Os filhotes dessa faixa etária, quando não-vacinados, são altamente susceptíveis ao desenvolvimento da doença. Os anticorpos maternos são protetores contra a infecção nas primeiras semanas de vida. No entanto, em um determinado momento, os níveis de anticorpos são insuficientes para proteger da doença e, em contrapartida, bloqueiam o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva pelas vacinas. Esse período é conhecido como “janela de susceptibilidade” e pode explicar porque alguns animais, mesmo

adequadamente vacinados, desenvolvem a infecção e a doença.

Os filhotes são mais propensos ao desenvolvimento da gastroenterite hemorrágica (GEH) pelo CPV, porém cães de qualquer idade, sexo ou raça podem ser acometidos. Animais de algumas raças de porte médio e grande, como dobermann, rottweiler, labrador, pastor alemão e pitbull, parecem apresentar a doença mais severa quando infectados. A incidência maior em animais sem raça definida provavelmente está ligada à vacinação inadequada, associada com o acesso livre à rua, o que aumenta o risco desses animais adquirirem a infecção.

O CPV é altamente contagioso, e a infecção geralmente ocorre por exposição oro-nasal a fezes, fômites ou ambientes contaminados. O vírus pode permanecer por longos períodos (mais de seis meses) no ambiente e nos pêlos dos animais que tiveram contato com fezes contaminadas. As pessoas, equipamentos veterinários, insetos e roedores podem atuar como veículos para a propagação do vírus.

Estudos sorológicos realizados em vários países indicam uma grande disseminação do agente, com índices variáveis de soropositividade em cães urbanos, geralmente entre 60 e 95%.

5.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

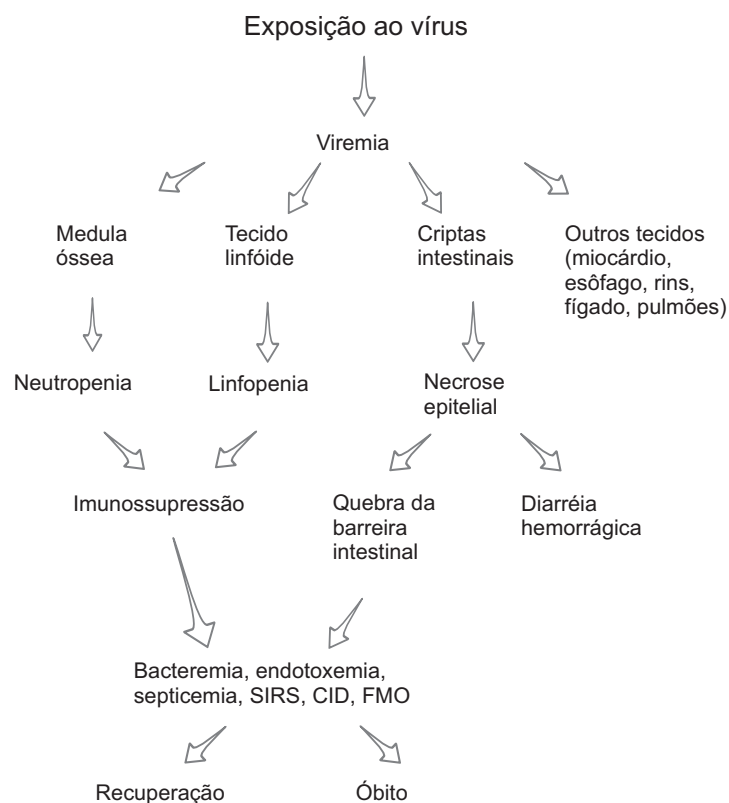
Após a exposição oronasal, o vírus replica nos tecidos linfóides próximos ao local de entrada (geralmente na orofaringe) e atinge a corrente sanguínea. Durante a disseminação virêmica, o vírus se localiza preferencialmente em tecidos com rápida divisão celular, como a medula óssea, órgãos linfopoiéticos e criptas do jejuno e íleo (Figura 14.7). O período de incubação varia de 2 a 14 dias, mas, na maioria dos casos, é de 4 a 7 dias. A viremia é intensa do primeiro ao quinto dia da infecção e cessa por volta do quinto ou sexto dia, quando anticorpos neutralizantes já podem estar presentes no soro. Os animais com imunidade parcial apresentam infecção subclínica ou formas clínicas mais brandas.

Durante a infecção intestinal, o parvovírus replica nas células epiteliais das criptas da mucosa intestinal. Essas células estão em constante mitose e são responsáveis pela reposição do epitélio absorptivo das vilosidades. As células das criptas se diferenciam em células de absorção à medida que migram para superfície das vilosidades. A consequência imediata da infecção pelo CPV é o achatamento das vilosidades, o colapso e a necrose epitelial, com exposição da lâmina própria da mucosa (Figuras 14.7 e 14.8). A diarreia, resultante da má absorção intestinal, costuma ser hemorrágica, pelo sangramento de capilares subjacentes ao revestimento epitelial da mucosa.

A perda do epitélio intestinal permite a penetração de bactérias na circulação sanguínea, que é facilitada pela leucopenia. A replicação do vírus nas células linfóides e na medula óssea resulta em linfopenia e neutropenia. A imunossupressão decorrente permite o estabelecimento de infecções secundárias por outros vírus, bactérias, fungos ou parasitas. Essas infecções podem contribuir para o agravamento dos sinais clínicos.

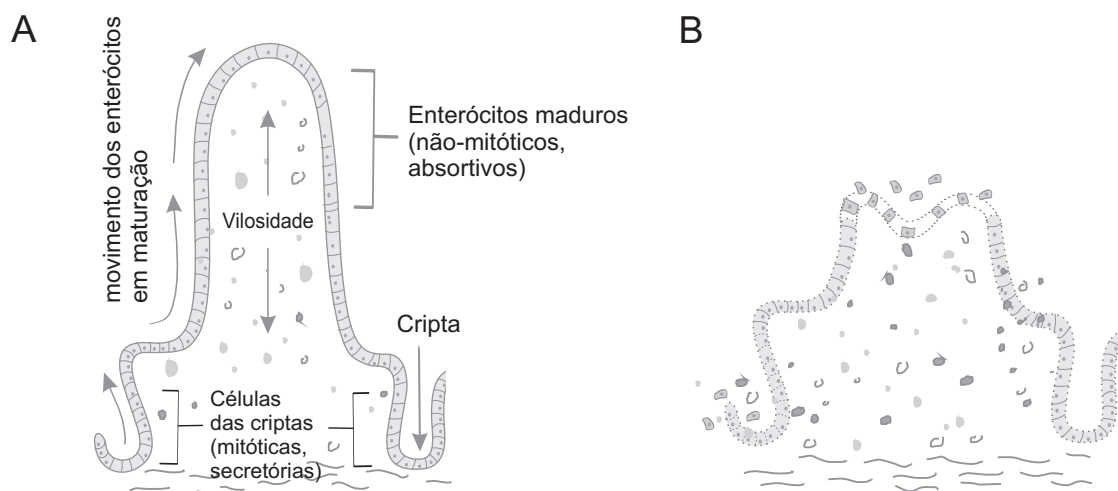
A excreção do vírus nas fezes inicia no terceiro ou quarto dia após a infecção e se intensifica com o surgimento da doença. O CPV é excretado em grandes quantidades por até 20 dias. O término da excreção viral fecal está provavelmente relacionado com o desenvolvimento de imunidade.

Duas síndromes clínicas são descritas em cães infectados com o CPV: a miocardite e a gastroenterite hemorrágica (GEH). A miocardite pode ocorrer em neonatos, após a infecção intra-uterina ou nas primeiras seis semanas de vida. Esses animais apresentam morte súbita ou sinais inespecíficos e, posteriormente, desenvolvem sinais de insuficiência cardíaca. Essa forma clínica da doença ocorreu com frequência quando foram relatados os primeiros surtos de parvovirose no final dos anos 1970. Atualmente essa manifestação é considerada muito rara, provavelmente pela alta prevalência de anticorpos contra o CPV na população canina. A imunidade passiva protege os filhotes na fase de ocorrência dessa forma clínica. A principal manifestação da parvovirose canina é a gastroenterite.



Fonte: adaptado de Greene (1998).

Figura 14.7 Patogenia da parvovirose canina. SIRS= síndrome da resposta inflamatória sistêmica, CID= Coagulação intravascular disseminada, FMO= Falência múltipla de órgãos.



Fonte: adaptado de Conner & Ramig (1997).

Figura 14.8 Ilustração da patogenia das lesões provocadas pelo parvovírus canino (CPV) no epitélio intestinal. A) Vilosidade intestinal com estrutura normal; B) Vilosidade afetada. A destruição das células das criptas pela replicação viral resulta em reposição deficiente das células absorptivas das vilosidades. Com isso, ocorrem necrose e descamação epitelial, achatamento das vilosidades e exposição da lâmina própria.

A apresentação típica da GEH geralmente ocorre em cães jovens não-vacinados, e é caracterizada pelo surgimento brusco de prostração, anorexia, vômitos freqüentes, sialorréia, febre, dor abdominal e diarreia hemorrágica. Os sinais de prostração, anorexia e vômitos precedem o quadro de diarreia, geralmente em 12 a 24 horas. Cães com diarreia podem apresentar desidratação, hipovolemia e choque. Os sinais clínicos iniciais de choque incluem taquicardia, pulso normal ou fraco, palidez das mucosas, tempo de preenchimento capilar aumentado, hipotensão, nível de consciência reduzido e temperatura corporal baixa. Os animais que não recebem tratamento (fluidoterapia) nesse estágio evoluem para o estágio terminal do choque, apresentando bradicardia, mucosas pálidas e cianóticas, hipotensão grave, pulso muito fraco ou ausente, hipotermia, anúria e estupor ou coma. Nessa situação, a parada cardíaca e respiratória é iminente e os animais que atingem esse estágio dificilmente sobrevivem.

O hemograma de animais infectados demonstra leucopenia, neutropenia e linfopenia. Na fase de recuperação, pode ocorrer leucocitose. Anemia pode ocorrer pela perda sangüínea intestinal. Hipoproteinemia, pela perda de proteínas plasmáticas pelo intestino, elevação dos níveis de uréia e creatinina por azotemia pré-renal e redução dos níveis de potássio também podem estar presentes.

Na necropsia, observa-se a mucosa intestinal congesta, hemorrágica e freqüentemente recoberta por uma pseudomembrana. As placas de Peyer encontram-se atrofiadas. A medula óssea pode apresentar-se liquefeita e hiperêmica. A histopatologia intestinal revela necrose epitelial, colapso das vilosidades e aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria.

5.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo na rotina clínica geralmente é feito pelo histórico, sinais clínicos e hemograma. Porém, o diagnóstico definitivo de parvovirose exige a identificação do vírus por testes específicos. Testes de ELISA para a detecção de antígenos virais nas fezes estão disponíveis no mercado brasileiro. Outros testes, como

a identificação do vírus por HA, sorologia pareada por HI e SN, testes de ELISA para a detecção de IgM, detecção dos vírions por ME podem ser utilizados para o diagnóstico definitivo. Em casos clínicos, a grande concentração de partículas virais nas fezes (pode chegar até 10^9 partículas/grama) e a estabilidade viral favorecem a utilização da ME. Uma alternativa é a imunomicroscopia (IME) eletrônica, na qual os anticorpos são adicionados às suspensões fecais para a formação de complexos que favorecem a visualização.

O isolamento do vírus a partir de fezes ou de tecidos pode ser realizado em células de origem canina, como as MDCK e A-72, e/ou em células CRFK de origem felina.

5.2.4 Controle e profilaxia

O tratamento da gastroenterite pelo CPV é de suporte e se baseia na reposição de fluidos e eletrólitos, na antibioticoterapia de amplo espectro e no controle dos vômitos, para minimizar as perdas líquidas e eletrolíticas. Terapias específicas com antivirais têm sido estudadas, sendo que o interferon-omega felino apresentou bons resultados em cães com parvovirose. É possível que essas substâncias possam fazer parte do tratamento de rotina no futuro.

Cães com parvovirose devem ser isolados e receber tratamento em um local específico. A limpeza e desinfecção do ambiente e equipamentos devem ser feitas com hipoclorito de sódio a 0,175%.

A maneira mais efetiva de prevenção da parvovirose canina é a vacinação sistemática de filhotes, que devem receber a primeira dose da vacina com seis a oito semanas de idade, recebendo duas doses de reforço a cada quatro semanas. Uma quarta dose pode ser efetuada aos seis meses de vida. A revacinação anual é recomendada. Esse esquema é recomendado para estimular a imunidade ativa à medida que a imunidade passiva declina, o que geralmente ocorre entre seis e 20 semanas de vida. Por um período de duas a quatro semanas, os títulos de anticorpos atingem níveis não-protetores, que interferem com a eficácia das vacinas. Ou seja, há um período em que os anticorpos passivos inativam o vírus vacinal, porém não são suficientes para proteger os

animais contra a infecção natural. Recomenda-se manter os animais isolados até completarem a fase de imunização, sempre observando a desinfecção do local.

Vacinas com cepas pouco atenuadas podem diminuir a janela de susceptibilidade, pois o vírus replica e estimula uma imunização ativa nos filhotes, mesmo com a presença de imunidade passiva. Nesses casos, alguns animais podem apresentar uma forma branda da enfermidade.

5.3 Parvovírus suíno

A infecção pelo parvovírus suíno (PPV) provavelmente é a causa mais freqüente e importante de falhas reprodutivas em suínos. Essas falhas são relacionadas com a infecção de embriões e fetos, que resulta em mortalidade embrionária, mumificação fetal, abortamentos, natimortalidade e o nascimento de leitões inviáveis. Além disso, a infecção pode resultar em infertilidade e repetições de cio. Em animais adultos não-gestantes, o PPV replica no intestino sem causar manifestações clínicas. As maiores consequências da infecção devem-se à infecção de fêmeas soronegativas, geralmente primíparas, durante a gestação.

Até o presente, somente um sorotipo do PPV foi identificado. Entretanto, existem diferenças de patogenicidade entre isolados de campo. O PPV é relacionado antigenicamente com outros membros do gênero *Parvovirus*, podendo ser diferenciado por testes de SN e HA. A capacidade hemaglutinante do PPV tem sido utilizada no diagnóstico da infecção, pelas técnicas de HA e HI. Outra característica importante do agente é a resistência a temperaturas ambientais e a variações de pH, o que garante que o vírus permaneça viável no ambiente por vários meses.

5.3.1 Epidemiologia

A infecção pelo PPV está amplamente distribuída na população suína de todo o mundo. Uma das razões para isso é a grande estabilidade do vírus no ambiente. Dessa forma, uma granja infectada pode manter o vírus durante meses, mesmo quando a higiene aparentemente é satisfatória. Nas maiores regiões produtoras de suínos, como o meio oeste dos Estados Unidos, a infecção pelo PPV é enzoótica na maioria dos rebanhos e,

com poucas exceções, todas as porcas apresentam imunidade contra o agente. Além disso, uma grande proporção das leitoas é naturalmente infectada com o PPV antes da cobertura, desenvolvendo imunidade protetora contra o vírus, que provavelmente persiste por toda a vida.

A introdução do PPV no rebanho pode ocorrer pela aquisição de reprodutores infectados. Quando o agente é introduzido em um rebanho negativo, a disseminação é rápida e muitas fêmeas apresentam falhas reprodutivas. Em alguns casos, a infecção pode ser controlada e o vírus pode até ser erradicado da propriedade, principalmente em criações pequenas (com menos de 100 matrizes). Nesses casos, a redução da incidência da doença ocorre pela redução ou ausência de animais susceptíveis, uma vez que a imunidade conferida pela infecção natural é longa e sólida. Os surtos em granjas em que não há controle por vacinação podem ocorrer em períodos cíclicos (normalmente a cada três a quatro anos), pela redução gradativa dos níveis de anticorpos.

As maiores fontes de infecção, para os animais susceptíveis dentro de uma granja, são as instalações contaminadas. O PPV é muito resistente a variações de temperatura e a vários desinfetantes comuns. Pode, portanto, permanecer infeccioso em excreções e secreções de animais infectados por vários meses. A ampla distribuição do agente também levanta hipóteses sobre a possibilidade de alguns suínos serem persistentemente infectados e excretarem o vírus periodicamente. Além disso, há evidências da ocorrência de portadores imunotolerantes que sobreviveram à infecção durante a fase fetal. No entanto, esses casos são raros e ainda não estão comprovados. Os machos podem desempenhar um papel importante na disseminação do PPV, uma vez que o vírus pode ser encontrado nos testículos. Além disso, os machos também podem atuar como vetores para a disseminação do vírus entre fêmeas susceptíveis.

Estudos sorológicos demonstraram a grande prevalência e disseminação do vírus no Brasil, principalmente nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No entanto, acredita-se que o PPV esteja disseminado em todas as regiões criadoras de suínos.

A transmissão do vírus ocorre pelas vias oronasal e transplacentária. A imunidade passiva

protege os leitões por longos períodos, podendo interferir com a imunidade ativa. Algumas fêmeas podem permanecer susceptíveis e, se forem infectadas durante a gestação, podem apresentar falhas reprodutivas. Até 50% das primíparas podem ser susceptíveis na época da primeira cobertura.

5.3.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A infecção pelo PPV inicia-se principalmente pela via oronasal, pelo contato com fezes ou com restos de aborto. No entanto, a transmissão por sêmen contaminado durante o coito também pode ocorrer. Não há evidências diretas de que a transmissão por sêmen produza problemas reprodutivos nas fêmeas infectadas. No entanto, acredita-se que as alterações que ocorrem no útero durante a infecção possam interferir em estágios avançados da gestação.

Após a penetração, o vírus replica em tecidos linfóides, na medula óssea e nas criptas do intestino delgado. A infecção pode ser crônica, com a replicação do vírus nas células intestinais e excreção nas fezes por períodos prolongados, contribuindo para a contaminação ambiental. Tecidos fetais e membranas de abortos possuem grande importância na transmissão e contaminação ambiental, devido à quantidade maciça de vírus presentes nesses fômites.

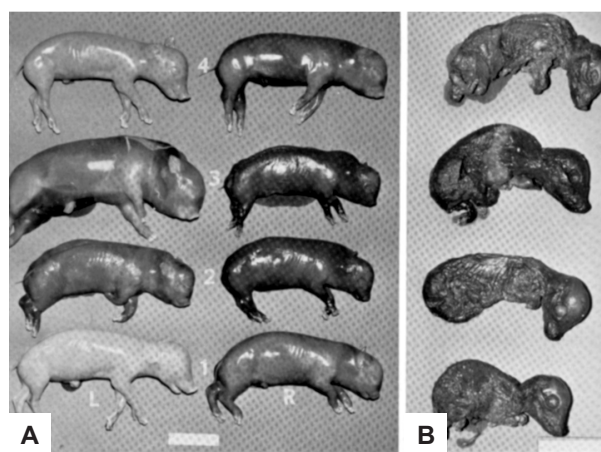
A infecção transplacentária ocorre durante a fase de viremia na fêmea gestante. Apesar da dificuldade de se detectar o vírus no epitélio uterino, não se descarta a possibilidade de infecção direta por replicação neste órgão e nas membranas placentárias. Outro mecanismo sugerido seria a transferência do vírus ao feto no interior de macrófagos.

O PPV apresenta particular avidez pelos tecidos do embrião e/ou do feto e seus envoltórios. O feto é sensível aos efeitos do vírus durante a primeira metade da gestação. Após este período, torna-se imunologicamente competente e capaz de eliminar a infecção pelo desenvolvimento de uma resposta imune ativa contra o vírus. A infecção embrionária ou fetal ocorre 10 a 15 dias após a infecção da fêmea, e a evolução depende do estágio de gestação. Na fase embrionária (até 30 dias

depois da concepção), a infecção geralmente leva à morte embrionária e reabsorção. Se a maioria dos embriões morrer, a fêmea pode retornar ao cio com intervalo prolongado. Se a maioria dos embriões resistir, o resultado será o nascimento de leitegadas pequenas, pois os embriões mortos são reabsorvidos.

A infecção fetal entre os 30 e 55 dias geralmente leva à morte e mumificação fetal. A gestação pode ser levada a termo, e a fêmea pode produzir uma leitegada composta por alguns leitões saudáveis e outros mumificados (Figura 14.9). A frequência de natimortos também pode estar aumentada e pode ser consequência do retardo na parição. A infecção fetal após os 70 dias geralmente não causa efeito deletério sobre os fetos, pois, nessa fase, já estão com o sistema imune desenvolvido e são capazes de responder imunologicamente à infecção.

Durante a infecção intra-uterina, o vírus é transmitido de um feto a outro, atingindo os diferentes fetos a determinados intervalos de tempo. Ou seja, a infecção de toda a leitegada não ocorre simultaneamente. Este fato pode explicar a presença de fetos mumificados em diferentes fases de desenvolvimento, muitas vezes mesclados com fetos normais (Figura 14.9).



Fonte: Mengeling (2006).

Figura 14.9. Efeitos do PPV na reprodução. A) Leitegada de uma porca inoculada experimentalmente com o PPV aos 34 dias de gestação. L: fetos do corno uterino esquerdo; R: fetos do corno direito. A foto foi tirada do animal abatido no dia 114 de gestação. B) Leitegada de uma porca infectada naturalmente com o PPV. Note o avançado grau de desidratação dos fetos.

Cabe ressaltar que a ocorrência de abortos é rara durante a infecção pelo PPV, e essa característica pode auxiliar no diagnóstico diferencial de outras infecções que causam perdas reprodutivas.

Os sinais da infecção geralmente são restritos às fêmeas primíparas e caracterizam-se por falhas reprodutivas, como o retorno ao cio, três a oito semanas após a inseminação ou coito. Algumas fêmeas permanecem sem retorno ao cio por períodos maiores. Geralmente não há descrição de sinais clínicos em outros animais da granja.

Dentre os sinais indicativos da infecção pelo PPV em uma granja destacam-se: a) nascimento de leitegadas pequenas, associadas com fetos mumificados de diferentes tamanhos, geralmente resultantes de fêmeas não-vacinadas ou de primeira cria; b) aumento das taxas de retorno ao cio; c) ausência de sinais clínicos nas fêmeas afetadas; d) gestação falsa em algumas fêmeas; e) leitegadas com fetos mumificados e normais; f) natimortalidade aumentada. Um resumo dos achados clínico-reprodutivos, em granjas afetadas de forma aguda pela parvovirose suína, está apresentado na Tabela 14.2.

Tabela 14.2 Achados clínico-reprodutivos observados durante surtos de infecção aguda pelo parvovírus suíno (PPV)

Parâmetro	Rebanho normal	Rebanho afetado
Número total de leitões nascidos	Normal	Reduzido
Vivos e mortos	11.5	< 9.5
% de leitegadas c/ < 9	Porcas (< 10%); marrãs (< 18%)	20-40%
Natimortos	4-7%	7-12%
Fetos mumificados	< 0,6%	1-4%
Porcas sem cria/vazias	1,0%	2-6%
Retorno retardado ao cio	< 3%	> 4%
Intervalo desmame-cio	Normal	Normal

As lesões são bem características e restritas aos fetos e útero. Os fetos podem apresentar diferentes aspectos e, pela infecção em diferentes fases, podem ser observados, em uma mesma leitegada, animais saudáveis, natimortos, em processo

de autólise e mumificados. Microscopicamente, observa-se necrose generalizada nos tecidos fetais com a presença de corpúsculos intranucleares. Inflamação e hipertrofia endotelial, além de infiltração de células mononucleares nas membranas placentárias e no epitélio uterino também são observados.

5.3.3 Diagnóstico

A presença da infecção pelo PPV deve ser investigada sempre que houver aumento nos índices de retorno ao cio e atraso na data de parição, associados com a presença de fetos mumificados e leitegadas com número reduzido de leitões, especialmente em fêmeas de primeiro ou segundo parto. Leitegadas, contendo alguns leitões normais e outros mumificados, frequentemente em diferentes estágios de desenvolvimento, são fortes indicativos da infecção. Esses sinais geralmente não são acompanhados por outras manifestações clínicas nas fêmeas.

O material a ser remetido para o laboratório para confirmação do diagnóstico deve incluir fetos mumificados, restos fetais e fragmentos de tecidos necróticos. Pode-se, ainda, enviar amostras de soro pareado das fêmeas (isto é, uma amostra coletada no momento da falha reprodutiva e outra coletada com 2 a 4 semanas de intervalo), amostras de soro dos fetos abortados, dos leitões natimortos ou dos leitões antes da ingestão do colostro.

Os fetos mumificados podem apresentar grande quantidade de antígenos virais, que podem ser detectados por ELISA e IFA. Pode-se, ainda, detectar o vírus por HA, realizada com eritrócitos de cobaias. Tecidos e fluidos fetais são indicados para serem testados por esta técnica. Nos casos em que a infecção ocorre no período inicial da gestação, a presença do vírus é de difícil detecção.

Em geral, os testes sorológicos são recomendados apenas quando tecidos de fetos mumificados não são disponíveis. O uso de sorologia apresenta restrições devido à ampla disseminação da infecção, o que dificulta a interpretação dos resultados. Nesse sentido, testes como a HI, SN e ELISA podem ser utilizados para o diagnósti-

co. No entanto, o seu uso é restrito a amostras de soro pareado e análise da variação dos títulos de anticorpos entre uma amostra e outra. A detecção de anticorpos no soro fetal, de natimortos e de leitões antes da primeira mamada são evidências da infecção intra-uterina, uma vez que anticorpos maternos não atravessam a barreira transplacentária nessa espécie.

O diagnóstico diferencial deve considerar outras infecções que cursam com perdas reprodutivas, como a doença de Aujeszky, infecção pelo vírus da síndrome respiratória e reprodutiva (PRRSV), leptospirose, entre outras. Deve-se levar em consideração que, na infecção pelo PPV, não ocorrem manifestações clínicas de doença em qualquer categoria animal e os abortos são raros.

5.3.4 Controle e profilaxia

Como a infecção pelo PPV é endêmica na maioria dos rebanhos suínos, o controle deve ser baseado na vacinação. Para esta finalidade, existem vacinas atenuadas e inativadas. No Brasil, só existem vacinas inativadas no comércio, podendo ser monovalentes ou combinadas com antígenos de outros agentes virais e/ou bacterianos. Recomenda-se a vacinação das fêmeas pelo menos 30 dias antes do período de cobertura (duas doses com 30 dias de intervalo) e a aplicação de reforços anuais. A imunidade passiva pode interferir com a vacinação de fêmeas em cobertura antes dos sete meses de idade. A vacinação de reprodutores machos jovens também tem sido indicada para aumentar a eficácia do programa de controle.

A prática de fornecimento de restos fetais e membranas placentárias para fêmeas não-gestantes não é recomendável, pelo risco de disseminação de outros agentes.

5.4 Parvovírus bovino

A infecção pelo parvovírus bovino (BPV), recentemente classificado no gênero *Bocavirus*, encontra-se disseminada mundialmente. Apesar de o agente ser freqüentemente isolado de fezes de bovinos sadios, existem relatos de associação do isolamento do BPV com doença entérica em neonatos e em bovinos jovens. Existem, ainda,

evidências de hipoplasia cerebelar congênita e de doença respiratória associadas com a infecção pelo BPV.

Acredita-se que a dificuldade em esclarecer o impacto patogênico desse agente está associada à dependência de outros fatores, tais como: manejo, falha da imunidade passiva e a presença de infecções concomitantes. Pode-se especular que a alta prevalência de anticorpos contra o agente em animais pode dificultar o aparecimento de casos clínicos decorrentes da infecção por este vírus.

No Rio Grande do Sul, um inquérito sorológico realizado com aproximadamente 4.000 bovinos leiteiros revelou 97% de positividade, sendo que 66,3% dos animais apresentavam um título maior que 160 pela técnica de HI.

Também existem evidências de resposta imune, tanto por anticorpos hemaglutinantes como neutralizantes, contra o BPV em fetos e terneiros recém-nascidos de vacas leiteiras sorologicamente positivas.

6 Bibliografia consultada

- CONNER, M.E.; RAMIG, R.F. Viral enteric diseases. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral Pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.30, p.713-743.
- DEVEY, J.J.; CROWE, D.T. Microenteral nutrition. In: BONAGURA, J.D. **Kirk's current veterinary therapy XIII**. Philadelphia: Saunders, 2000. p.136-140.
- GAMOH, K. et al. The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.1027-1029, 2003.
- GASKELL, R.M.; BENNETT, M. Doenças infecciosas felinas. In: DUNN, J.K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. p.953-978.
- GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 356p, 1998.
- GUILFORD, W.G.; STROMBECK, D.R. Gastrointestinal tract infections, parasites, and toxicoses. In: GUILFORD, W.G. et al. **Small animal gastroenterology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1996. p.411-432.
- HOSKINS, J.D. Canine viral enteritis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p.40-49.
- HOSKINS, J.D. Update on canine parvoviral enteritis. **Veterinary Medicine**, v.92, p.694-709, 1997.

- HOUSTON, D.M.; RIBBLE, C.S.; HEAD, L.L. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, p.542-546, 1996.
- HÜBNER, S.O. et al. Infecção intra-uterina e evolução da imunidade passiva contra o parvovírus bovino. **Revista de Patologia Tropical**, v.25, p.263-271, 1996.
- HÜBNER, S.O. et al. Levantamento sorológico de parvovírus bovino no rebanho leiteiro do RS, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.113-121, 1996.
- HUEFFER, K.; PARRISH, C.R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.392-398, 2003.
- IKEDA, Y. et al. Apoptosis in feline panleukopenia virus-infected lymphocytes. **Journal of Virology**, v.72, p.6932-6936, 1998.
- IKEDA, Y. et al. Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.341-346, 2002.
- ISHIWATA, K.; MINAGAWA, T.; KAJIMOTO, T. Clinical effects of the recombinant feline interferon-omega on experimental parvovirus infection in beagle dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.60, p.911-917, 1998.
- MACINTIRE, D.K.; SMITH-CARR, S. Canine parvovirus. Parte II. Clinical signs, diagnosis, and treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.19, p.291-302, 1997.
- MANI, B. et al. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence, N-VP2 cleavage and uncoating of the full-length genome. **Journal of Virology**, v.80, p.1015-1024, 2006.
- MARTIN, V. et al. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. **Veterinary Microbiology**, v.89, p.115-127, 2002.
- MENGELING, W.L. Porcine Parvovirus. In: LEMAN, A.D. et al. (eds). **Diseases of swine**. 7.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1992. Cap.23, p.299-311.
- MENGELING, W.L.; CUTLIP, R.C.; BARNETT, D. Porcine parvovirus: pathogenesis, prevalence and prophylaxis. **Proceedings of the International Congress of the Pig Veterinary Society**, v.5, p.KA15, 1978.
- MINAGAWA, T.; ISHIWATA, K.; KAJIMOTO, T. Feline interferon-omega treatment on canine parvovirus infection. **Veterinary Microbiology**, v.69, p.51-53, 1999.
- MOHR, A.J. et al. Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss, and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17, p.791-798, 2003.
- MURPHY, F.A. et al. Parvoviridae. In: _____. **Veterinary virology**, 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap 21, p.343-356.
- MUZYCZKA, M.; BERNIS, K.I. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.69, p.2327-2359.
- NAKAMURA, K. et al. Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p.663-668, 2001.
- PARRISH, C.R. et al. Natural variation of canine parvovirus. **Science**, v.230, p.1046-1048, 1985.
- PARRISH, C.R. et al. Global spread and replacement of canine parvovirus strains. **Journal of General Virology**, v.69, p.1111-1116, 1988.
- PARRISH, C.R. Emergence, natural history and variation of canine, mink and feline parvoviruses. **Advances in Virus Research**, v.38, p.403-450, 1990.
- PARRISH, C.R. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. **Bailliere's Clinical Haematology**, v.8, p.57-71, 1995.
- PEREIRA, C.A.D. et al. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.127-133, 2000.
- POLLOCK, R.V.; COYNE, M.J. Canine parvovirus. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v.23, p.555-568, 1993.
- POLLOCK, R.V.H.; POSTORINO, N.C. Feline panleukopenia and other enteric viral diseases. In: SHERDING, R.G. **The cat diseases and clinical management**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, v.1, 1994. p.479-487.
- SHACKELTON, L.A. et al. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.379-384, 2005.
- SMITH-CARR, S.; MACINTIRE, D.K.; SWANGO, L.J. Canine parvovirus. Parte I. Pathogenesis and vaccination. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.19, p.125-133, 1997.

1 Introdução	399
2 Classificação	400
3 Estrutura e propriedades dos vírions	402
4 Estrutura e organização genômica	402
5 O ciclo replicativo	404
5.1 Adsorção, penetração e desnudamento	404
5.2 Transcrição e expressão das proteínas virais	404
5.3 Replicação do genoma	404
5.4 Montagem do capsídeo e egresso	405
6 Patogenia	405
7 Patologia	405
8 Papilomavírus e tumores	406
9 Diagnóstico	407
10 Imunologia	407
11 Imunoprofilaxia	408
12 Doenças de importância em medicina veterinária causadas por papilomavírus	409
12.1 Papilomatose	409
12.2 Hematúria enzoótica e tumores no trato digestório superior de bovinos	410
13 Bibliografia consultada	411

1 Introdução

Os vírus da família *Papillomaviridae* infectam diferentes espécies de mamíferos e aves e caracterizam-se pela propriedade oncogênica, que é responsável pela produção de lesões tumorais, benignas e malignas, nos epitélios cutâneo e mucoso. Em medicina veterinária, as lesões ocasionadas pela infecção com os papilomavírus determinam prejuízos econômicos consideráveis à bovinocultura tanto por perdas diretas, causadas pela morte de animais, quanto indiretas, representadas por reduções na produtividade e no valor comercial dos animais e subprodutos como o couro. Em bovinos, a correlação entre a infecção pelo papilomavírus e o desenvolvimento de neoplasias tem sido extensivamente avaliada, não apenas pela repercussão econômica da infecção, mas também por ser um modelo experimental interessante para o estudo do sinergismo com fatores ambientais na etiologia das neoplasias.

A infecção por membros da família *Papillomaviridae* ocasiona enfermidades semelhantes nas diversas espécies acometidas e está amplamente distribuída em todo o mundo. As lesões cutâneas são comumente denominadas *papilomatose* ou apenas verrugas, e são relatadas em quase todas as espécies de mamíferos e em algumas aves e animais marinhos. A infecção do epitélio mucoso geralmente está associada com a formação de tumores malignos. Em seres humanos, a infecção pelo papilomavírus está intimamente associada ao câncer do colo do útero; e, em bovinos, a tumores vesicais (hematúria enzoótica bovina) e no trato digestório superior (caraguatá).

A ocorrência de papilomas cutâneos em humanos é descrita há séculos e está presente em relatos de origem grega e romana. As lesões mucosas do colo do útero foram amplamente relatadas na Idade Média, ocasião em que todas as doenças sexualmente transmissíveis eram consideradas como ocasionadas por um único agente. O estudo do papilomavírus animal também tem uma longa história. Em 1898, M'Fadycan e Hobday relataram a etiologia infecciosa do papilomavírus oral canino (COPV). No entanto, o primeiro papilomavírus animal foi identificado somente em 1933, por Richard Shope, que estudou o *cottontail*

rabbit papillomavirus (CRPV), que foi o primeiro vírus DNA oncogênico identificado. O CRPV foi um importante modelo para os estudos pioneiros sobre a oncogênese viral. Entretanto, assim como todos os outros membros dessa família, o CRPV também se manteve refratário aos estudos virológicos padrões pela incapacidade de propagação do vírus em sistemas de cultivos celulares. Na década de 1950, os estudos com os papilomavírus perderam campo para os membros da família *Polyomaviridae*, que podem ser cultivados e multiplicados em cultivos de células convencionais.

Por muitos anos, os papilomavírus, tanto na medicina humana quanto na veterinária, foram considerados de pouco interesse. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e clonagem gênica na década de 1970, o primeiro genoma de papilomavírus foi clonado com sucesso. Esse passo foi importante para o reinício das pesquisas com os papilomavírus, que possuem vários genes com potencial oncogênico e são de grande importância no estudo da oncologia molecular. As mudanças na percepção da importância das infecções, em conjunto com o avanço tecnológico da biologia molecular, conduziram à intensificação das pesquisas que proporcionaram aos papilomavírus uma posição de destaque no estudo do câncer e da virologia molecular.

Historicamente, os papilomavírus foram agrupados em conjunto com os poliomavírus, constituindo a família *Papovaviridae*, cujo nome é derivado das iniciais de seus três membros (*Papillomavirus*, *Polyomavirus* e *Simian Vacuolating Agent* – SV40). Todos os três diferentes vírus apresentam propriedades semelhantes (tamanho e forma do vírion, ausência de envelope e genoma constituído por DNA fita dupla circular). Apenas com base no diâmetro médio dos vírions, a família *Papovaviridae* inicialmente incluía dois gêneros: o *Polyomavirus*, com as espécies poliomavírus e o SV40, e o *Papillomavirus*. Estudos moleculares comparativos indicaram diferenças fundamentais entre eles, destacando-se o tamanho do genoma e a organização genômica, na qual, praticamente, não são observadas similaridades na sequência de nucleotídeos. Com isso, no ano 2000, o 7º Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) reclassificou a família *Papovaviridae* em famílias

Tabela 15.1. Classificação e doenças associadas com os papilomavírus

Gênero	Biologia/patologia	Espécies	Espécies/nº de tipos
<i>Alphapapillomavirus</i>	Lesões cutâneas e mucosas em humanos e primatas.	15	Papilomavírus humano – 32
<i>Betapapillomavirus</i>	Lesões cutâneas em humanos, geralmente de forma latente. É ativado após eventos imunossupressivos.	5	Papilomavírus humano – 5
<i>Gamma papillomavirus</i>	Lesões cutâneas em humanos com corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos característicos.	5	Papilomavírus humano – 4
<i>Deltapapillomavirus</i>	Lesões fibropapilomatosas em ungulados. Infecções interespecíes são relatadas.	4	Papilomavírus do alce europeu
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	Lesões cutâneas em bovinos.	1	Papilomavírus bovino – 5
<i>Zetapapillomavirus</i>	Lesões cutâneas em eqüinos.	1	Papilomavírus eqüino – 1
<i>Etapapillomavirus</i>	Lesões cutâneas em aves.	1	Papilomavírus do <i>Fringilla coelebs</i>
<i>Lotapapillomavirus</i>	Lesões cutâneas em roedores.	1	Papilomavírus <i>Mastomys natalensis</i>
<i>Thetapapillomavirus</i>	Lesões cutâneas em aves.	1	Papilomavírus <i>Psittacus erithacus timneh</i>
<i>Kappapapillomavirus</i>	Lesões cutâneas e de mucosas em coelhos.	2	Papilomavírus do coelho cauda-de-algodão
<i>Lambdapapillomavirus</i>	Papilomavírus animal que causa lesões cutâneas e de mucosas.	2	Papilomavírus oral canino
<i>Mupapillomavirus</i>	Lesões cutâneas em humanos com corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos característicos.	2	Papilomavírus humano – 1
<i>Nupapillomavirus</i>	Lesões cutâneas benignas e malignas em humanos.	1	Papilomavírus humano – 41
<i>Xipapillomavirus</i>	Papilomavírus que induz verdadeiros papilomas no hospedeiro, causando lesões cutâneas e de mucosas.	1	Papilomavírus bovino – 3
<i>Omikronpapillomavirus</i>	Isolado de lesões genitais em cetáceos.	1	Papilomavírus do <i>Phocoena spinipinnis</i>
<i>Pipapillomavirus</i>	Lesões mucosas em hamsters.	1	Papilomavírus oral dos hamsters

Fonte: ICTV (2004).

Papillomaviridae e *Polyomaviridae*. Nessa ocasião, a família *Papillomaviridae* continha apenas um gênero, o *Papillomavirus*. Em 2004, o 8º ICTV propôs a existência de 16 gêneros (Tabela 15.1).

2 Classificação

A família *Papillomaviridae* encontra-se em ativa expansão. Uma característica viral de grande importância para a classificação é a impossibilidade de isolamento dos papilomavírus em cultivo celulares convencionais, o que dificulta o processo de identificação e experimentação, as-

sim como a caracterização de alterações celulares e patológicas da infecção. Nos últimos 30 anos, com os avanços da biotecnologia, a taxonomia dessa família viral tem evoluído com base em algoritmos filogenéticos para a comparação de sequências genômicas e subgenômicas. Existem fortes evidências de que o genoma dos papilomavírus é relativamente estável e de que pequenas variações provavelmente ocorram na mesma frequência que em outros vírus DNA.

De acordo com o ICTV, a atual classificação dos papilomavírus teve o objetivo de estabelecer a relação entre os tipos de papilomavírus, com-

parar o termo “tipo” de papilomavírus nos padrões taxonômicos “espécie” e “gênero” e investigar a relação entre a classificação taxonômica e as propriedades biológicas e patológicas. Assim, a família *Papillomaviridae* foi avaliada em bases filogenéticas e, atualmente, é composta por 16 gêneros (Tabela 15.1). Alguns desses agrupamentos filogenéticos coincidem com as propriedades biológicas e patológicas, enquanto outros divergem, mostrando apenas relações moleculares.

Os papilomavírus são altamente espécie/tecido-específicos e têm sido descritos em diversas espécies de mamíferos, como seres humanos, animais domésticos e selvagens, assim como em algumas espécies de aves. Infecções entre diferentes espécies hospedeiras são relatadas; no entanto, nenhum caso de infecção produtiva foi comprovado na segunda espécie. As espécies de

papilomavírus que infectam animais estão apresentadas na Tabela 15.2. A classificação por sorotipos não é utilizada para a sistemática dos papilomavírus, que se baseia na espécie hospedeira, na origem e extensão das lesões, e no genoma viral, sendo referido como genótipos virais.

O gene L1, que codifica a principal proteína do capsídeo, é o mais conservado do genoma viral e tem sido utilizado para a identificação de novos tipos de vírus. Um novo isolado de papilomavírus é reconhecido quando, após o sequenciamento da sequência codificante L1 (ORF, sequência aberta de leitura, L1), houver diferença superior a 10% com os papilomavírus conhecidos e com sequências disponíveis em bancos genômicos. Diferença entre dois e 10% na homologia define um subtipo, e inferior a 2% define uma variante viral.

Tabela 15.2. Espécies de papilomavírus que infectam animais

Gênero	Espécies	Espécie/tipo	Outros papilomavírus
<i>Deltapapillomavirus</i>	1	Papilomavírus do alce europeu (EEPV)	Papilomavírus do cervo <i>reindeer</i>
	2	Papilomavírus do cervo (DPV)	-
	3	Papilomavírus ovino 1 (OvPV-1)	OvPV-2
	4	Papilomavírus bovino 1 (BPV-1)	BPV-2
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	1	Papilomavírus bovino 5 (BPV-5)	-
<i>Zetapapillomavirus</i>	1	Papilomavírus eqüino 1 (EcPV-1)	-
<i>Etapapillomavirus</i>	1	Papilomavírus do Chaffinch (ChPV)	-
<i>Thetapapillomavirus</i>	1	Papilomavírus dos papagaios (PePV)	-
<i>Kappapapillomavirus</i>	1	Papilomavírus do coelhos cauda-de-algodão (CRPV)	-
	2	Papilomavírus oral dos coelhos (ROPV)	-
<i>Lambdapapillomavirus</i>	1	Papilomavírus oral canino (COPV)	-
	2	Papilomavírus felino (FDPV)	-
<i>Xipapillomavirus</i>	1	Papilomavírus bovino 3 (BPV-3)	BPV-4 e BPV-6
<i>Pipapillomavirus</i>	1	Papilomavírus oral dos hamsters (HaPV)	-
Não-classificado	-	Papilomavírus bovino 7 (BPV-7)	-

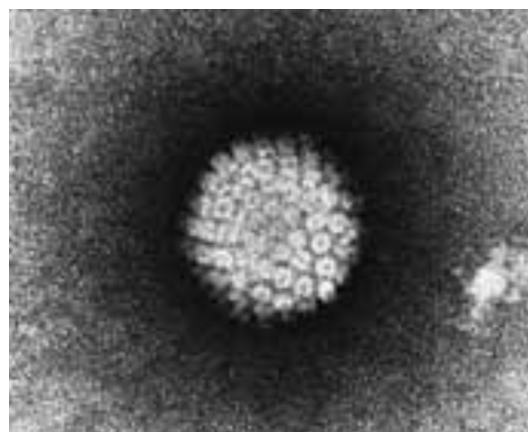
Embora ainda não utilizada com muita frequência, a classificação dos papilomavírus em gênero e espécie também foi recentemente definida em bases filogenéticas. Diferentes gêneros apresentam menos de 60% de similaridade na sequência de nucleotídeos da ORF L1 e entre 23 e 43% de similaridade na sequência completa do genoma viral. Entre as espécies virais pertencentes ao mesmo gênero, devem ser encontradas semelhanças entre 60 e 70% na sequência da ORF L1.

Atualmente, os bancos genômicos dispõem da sequência completa do genoma de 118 tipos de papilomavírus. Porém, esse número deve ser constantemente reavaliado, uma vez que novos estudos têm conduzido à determinação de novos tipos, subtipos e variantes virais com grande frequência.

3 Estrutura e propriedades dos vírions

Os papilomavírus são pequenos vírus oncogênicos não-envelopados, com 52 a 55 nm de diâmetro. O capsídeo viral, com simetria icosaédrica, é composto por 72 capsômeros, sendo 60 capsômeros que se ligam de forma hexavalente e 12, de forma pentavalente. Os capsômeros são arranjados em superfícies com triangulação $T = 7$, originando à microscopia eletrônica o aspecto arredondado (Figura 15.1). Cada capsômero é composto por duas proteínas codificadas pelo vírus: a proteína principal (L1) e a proteína secundária (L2). Partículas semelhantes ao vírus (VLPs) podem ser produzidas pela expressão somente da proteína L1 ou pela combinação das proteínas L1 e L2. Os vírions apresentam coeficiente de sedimentação (S_{20}^w) de 300 e densidade no cloreto de cério de 1.34 g/mL.

O ácido nucléico dos papilomavírus consiste de uma molécula de DNA de fita dupla circular, com 7.3 a 8 kpb. Nos vírions e nas células hospedeiras, o genoma está conjugado com histonas, formando um complexo semelhante à cromatina celular. A massa molecular do ácido nucléico é de 5.0×10^6 daltons e representa 12% da massa do vírion. A partícula viral é resistente às condições do meio ambiente e a solventes lipídicos, como o éter e o clorofórmio.

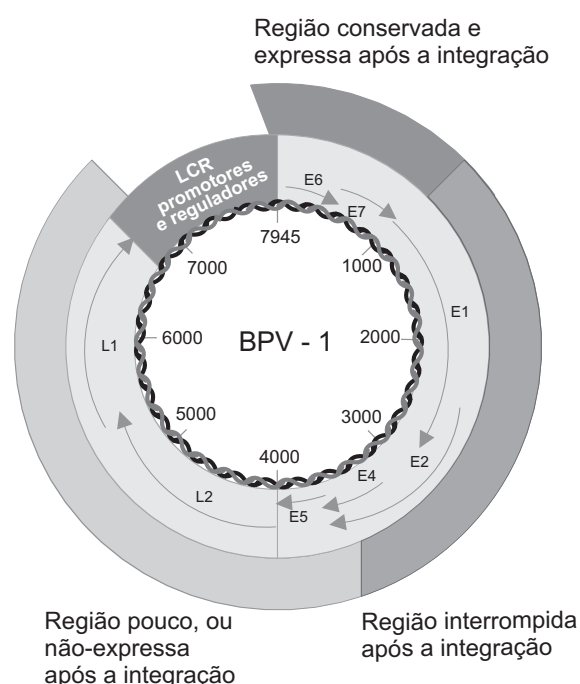


Fonte: www.oralcancerfoundation.org

Figura 15.1. Fotomicrografia eletrônica de um papilomavírus humano.

4 Estrutura e organização genômica

Apesar do tamanho relativamente pequeno, a organização do genoma dos papilomavírus é muito complexa (Figura 15.2). Não são observa-



Fonte: Alfieri, A.A.

Figura 15.2. Ilustração esquemática da organização do genoma do papilomavírus bovino tipo 1.

das diferenças na organização genômica entre os gêneros de papilomavírus. Todas as ORFs estão localizadas em uma das fitas do DNA viral, indicando que apenas uma fita é utilizada como molde para codificar as proteínas virais. A fita codificante contém cerca de 10 ORFs, classificadas em dois segmentos principais, conforme a fase de transcrição: o segmento E contém oito ORFs a serem traduzidas, chamadas de iniciais (*early* – E), e o segmento L contém duas ORFs tardias (*late* – L). As ORFs E e L são encontradas em locais distintos do genoma. O segmento E representa 45% do genoma viral e codifica proteínas necessárias para as fases iniciais de replicação e transcrição viral. Nesse segmento, estão as ORFs que codificam as proteínas regulatórias e as proteínas oncogênicas dos papilomavírus. As proteínas iniciais são expressas em células recém-infectadas, em infecções não-produtivas, assim como em células transformadas. O segmento L representa 40% do

genoma viral e codifica as proteínas do capsídeo (L1 e L2), que são produzidas nas fases tardias da replicação viral e são encontradas apenas nas infecções produtivas. As ORFs dos papilomavírus estão sobrepostas e aninhadas, compactando vários genes em uma pequena extensão do genoma. A massa molecular e a função das proteínas virais são bem conservadas entre as diferentes espécies de papilomavírus.

Entre os segmentos genômicos L e E existe outro segmento, denominado LCR (*long control region*), que representa 15% (500-1.000 pb) do genoma viral. Essa região não codifica proteínas, mas contém elementos promotores e regiões regulatórias da replicação viral. A maioria dos elementos *cis* de regulação da replicação e transcrição do material genético, assim como o ponto de origem (*ori*) da replicação estão contidos nessa região.

Em síntese, no genoma dos papilomavírus, são encontrados três oncogenes (E5, E6 e E7), que

Tabela 15.3. Proteínas codificadas pelo papilomavírus bovino tipo 1

Proteína	Tamanho (aminoácidos)	Função
E1	605	Em conjunto com a E2, é a primeira proteína a ser produzida. É uma helicase dependente de ATP que separa as cadeias do DNA viral e age como fator de elongação na replicação do DNA. Atua como proteína regulatória de oncogenes virais.
E2	306	Está envolvida tanto no controle da transcrição quanto na replicação do DNA. Atua como proteína regulatória de oncogenes virais.
E4	120	São pequenas proteínas, expressas tardiamente, produzidas por <i>splicing</i> alternativo e modificada após a tradução. Estão envolvidas na transformação da célula hospedeira, desregulando a mitogênese.
E5	44	Proteína de transformação celular que interage com receptores de fatores de crescimento, obstruindo os mecanismos de supressão do crescimento. Altera o controle do ciclo celular.
E6	137	Proteína de transformação celular que ao se ligar à p53 (proteína de supressão de tumores), ocasiona a sua degradação. Altera o controle do ciclo celular.
E7	127	Proteína de transformação celular que ao se ligar à pRb ou p107 (proteínas de supressão de tumores) ocasiona a sua degradação. Altera o controle do ciclo celular.
L1	495	Proteína principal do capsídeo. Representa 80% do capsídeo protéico e contém epitopos que induzem anticorpos neutralizantes.
L2	469	Proteína secundária do capsídeo viral. Também contém epitopos que induzem anticorpos neutralizantes.

modulam os processos de transformação celular; dois genes que codificam proteínas reguladoras (E1 e E2), que modulam a transcrição e a replicação; e dois outros genes que codificam as proteínas estruturais (L1 e L2) que compõem o capsídeo viral. As ORFs E1, E2, L1 e L2 são particularmente bem conservadas entre todos os membros dessa família. Na Tabela 15.3, estão apresentadas as proteínas codificadas pelos papilomavírus bovino tipo 1 e suas respectivas funções.

O genoma dos papilomavírus pode ser encontrado no núcleo da célula infectada sob duas formas físicas: a episomal e a integrada. A episomal é encontrada em lesões iniciais e benignas, sob a forma circular e em múltiplas cópias. A forma integrada é encontrada apenas em células transformadas. Nessa forma, o genoma do papilomavírus encontra-se integrado ao cromossomo da célula hospedeira, com uma única cópia por célula. A integração do genoma viral ao cromossomo celular ocorre de forma aleatória, porém todas as células infectadas apresentam a integração no mesmo sítio.

5 O ciclo replicativo

5.1 Adsorção, penetração e desnudamento

A infecção pelo papilomavírus é iniciada com a adsorção dos vírions à superfície das células basais do epitélio. O receptor responsável pela ligação dos vírions é uma molécula conservada, presente na membrana celular, porém a sua identidade não é conhecida. O vírus penetra, provavelmente, por meio de endocitose e é transportado pelo citoesqueleto em direção ao núcleo. Durante essa etapa, ocorre a desestruturação e a perda do capsídeo viral, processo ainda pouco compreendido. Utilizando os poros nucleares, o DNA viral penetra no núcleo da célula hospedeira.

5.2 Transcrição e expressão das proteínas virais

A expressão das proteínas codificadas pelos papilomavírus é complexa devido à presença de

múltiplos promotores e formas alternativas de transcrição. Os primeiros indicadores de transcrição do genoma aparecem cerca de quatro semanas após a infecção, quando pode ser detectada a expressão dos genes iniciais E1 e E2. Na infecção produtiva, as células da camada basal da epiderme, que possuem a capacidade de se multiplicar, aumentam a taxa de proliferação. Esse efeito, provavelmente, deva-se à combinação das ações das proteínas expressas pelo gene E5, que atuam em conjunto com receptores de fator de crescimento epidérmico; proteína viral E6, que se liga à proteína p53; e proteína E7, que se liga à proteína retinoblastoma (Rb). As oncoproteínas virais interferem, dessa forma, no ciclo vegetativo celular.

A transformação promovida pelos papilomavírus é complexa e depende dos produtos dos genes iniciais. As proteínas de transformação podem ser diferentes entre os vários tipos virais, e o mecanismo de ação dessas proteínas ainda não está totalmente elucidado. O princípio geral consiste em duas ou mais proteínas iniciais cooperando para formar o fenótipo transformado. Alguns vírus podem transformar células por si só, como o papilomavírus bovino tipo 1 (BPV-1), e outros requerem a cooperação com um oncogene celular ativado, como o papilomavírus humano tipo 16 (HPV-16). Na maioria dos casos, parte ou todo o genoma do papilomavírus é mantido nas células tumorais. Em casos excepcionais, como o papilomavírus bovino tipo 4 (BPV-4), o DNA viral pode ser perdido antes da transformação.

5.3 Replicação do genoma viral

A replicação do genoma viral ocorre no núcleo celular e é realizada em diferentes etapas, de acordo com as fases de diferenciação das células do epitélio. Inicialmente, nas células abaixo da superfície da derme, o DNA viral é amplificado até um total de 50 a 400 cópias por célula. Após esta fase inicial de replicação, o DNA viral passa a ser replicado em conjunto com o ciclo de divisão celular e o número de cópias virais por célula permanece constante. Nas células diferenciadas da epiderme, o DNA viral é amplificado em grande número de cópias por célula e de forma descontrolada.

5.4 Montagem do capsídeo e egresso

A montagem, maturação e a subsequente produção de vírions ocorrem no núcleo celular. As proteínas tardias, L1 e L2, são expressas e a montagem do capsídeo ocorre mesmo sem a presença do DNA viral. Essa característica é de grande importância para a produção de VLPs que apresentam potencial para utilização em vacinas. As partículas virais são liberadas por interferência da proteína codificada a partir do gene E4, que desestabiliza a rede de queratina intracelular. Os vírions são, então, agrupados e liberados das células.

6 Patogenia

Cada papilomavírus apresenta especificidade por uma única espécie animal, na qual se replica de forma produtiva. Alguns tipos virais podem infectar uma segunda espécie animal. Nesses casos, produzem uma infecção não-produtiva, ou seja, sem a produção de vírions infecciosos, como ocorre no sarcóide equino, que é um exemplo de infecção heteróloga ocasionada pelos BPV-1 e BPV-2.

Os papilomavírus são também tecido-específicos, com tropismo por células do epitélio escamoso. Os receptores celulares responsáveis por esse tropismo ainda não são conhecidos, no entanto, alguns tipos de papilomavírus apresentam tropismo pelo epitélio cutâneo e outros pelo epitélio mucoso. Outro aspecto importante é que os papilomavírus necessitam da diferenciação celular do epitélio. Portanto, o cultivo em células indiferenciadas não pode ser realizado com êxito, visto que as células podem ser infectadas, mas não ocorre a infecção produtiva. O ciclo de replicação viral é completado nos processos de diferenciação das células epiteliais. Inicialmente, o vírus infecta os queratinócitos basais, provavelmente por meio de microlesões; expressa parte dos seus genes nas camadas basal e suprabasal; replica o genoma viral na região de diferenciação das camadas espinhosa e granular; expressa os genes estruturais e transfere o DNA para as células da camada escamosa, onde a progênie viral é finalmente liberada após a descamação celular normal do epitélio. Ou seja, as diferentes etapas

da replicação ocorrem sucessivamente de acordo com o estágio de diferenciação celular (Figura 15.3).

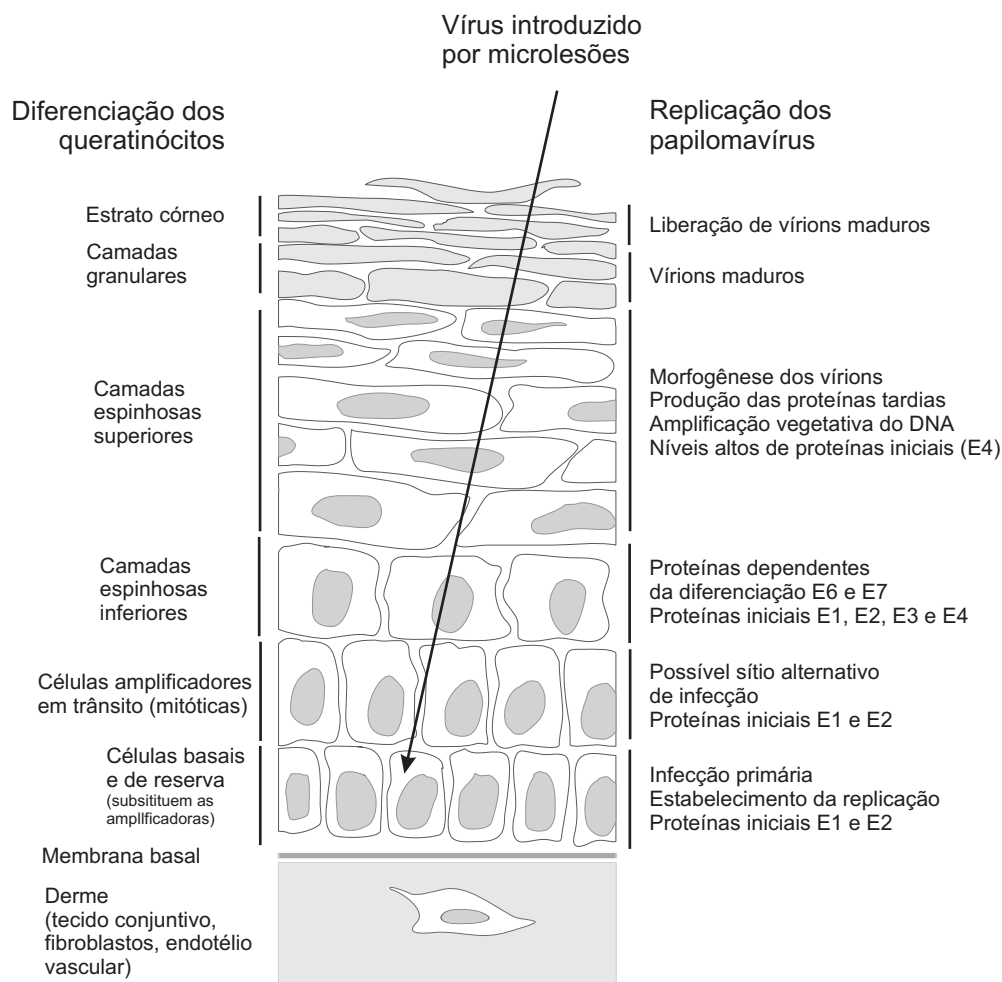
O período de incubação das patologias induzidas pelos papilomavírus varia de acordo com o local da célula infectada. As verrugas nas mãos e pés de seres humanos apresentam longo período de incubação (6 a 18 meses), enquanto as verrugas genitais têm período de incubação de 2 a 6 meses.

Os papilomavírus podem também ser encontrados em células polimorfonucleares do sangue periférico, no entanto, não existem evidências da sua multiplicação nessas células. Essa observação é importante pela implicação que pode ter na patogênese da infecção, pois sugere que a corrente sanguínea pode carrear o vírus para diferentes tecidos.

7 Patologia

A infecção pelo papilomavírus pode ocasionar alterações na morfologia e função celular. Essas alterações são reflexos das mudanças genéticas e fisiológicas que se acumulam por longos períodos de tempo, levando à perda progressiva do controle do ciclo celular, imortalização celular e transformação tumoral.

Nas células epiteliais transformadas, podem ser observadas alterações do tipo hiperplasia e hipertrofia. As células germinativas não são permissivas à replicação viral e, ao se dividirem e se deslocarem para a superfície, disseminam o vírus a todas as células irmãs que, então, passam por processos de transformação e de proliferação de forma displásica, induzidos pelo vírus. A camada celular fica mais espessa, com células vacuolizadas, adquirindo a aparência clássica de papiloma. Assim, o aspecto de “verruga” deve-se à proliferação e não à destruição celular. À medida que as células infectadas passam pelo processo de diferenciação e queratinização, elas se tornam permissivas à replicação viral. Os vírions podem reinfectar as células adjacentes, sendo esta a razão pela qual os papilomas cutâneos são contagiosos e aparecem agrupados. A infecção de várias células basais origina colônias celulares sobrepostas, com a aparência de “verruga” em forma de couve-flor.



Fonte: adaptada de Frazer (2004) e Chow e Braker (1997).

Figura 15.3. Ilustração esquemática da infecção pelo papilomavírus em epitélio cutâneo.

8 Papilomavírus e tumores

A progressão neoplásica é um processo sem perspectiva para o vírus, visto que a célula transformada não é mais permissiva à maturação dos vírions. O genoma viral é incorporado pela célula, mantido como um elemento extracromossômico, com replicações sincronizadas com o ciclo celular, ou pode até mesmo ser perdido pelas células transformadas.

O papilomavírus está associado com neoplasias, incluindo carcinomas urogenitais e câncer do trato respiratório superior em humanos, câncer de pele em humanos e coelhos, câncer do canal alimentar superior e de bexiga em bovinos,

carcinoma oral em cães e, possivelmente, câncer do trato alimentar e de bexiga em humanos.

Embora a etiologia viral de tumores esteja bem estabelecida, os mecanismos moleculares induzidos pelo vírus sobre a célula transformada ainda não são bem compreendidos. O DNA viral pode não estar presente em muitos tumores e em células transformadas *in vitro*. Essa característica sugere que o vírus possa ser o responsável pelos eventos iniciais da carcinogênese, mas não pela continuidade das transformações fenotípicas, quando a informação genética do vírus não é necessária para a manutenção da malignidade. Também não está claro como os fatores carcinogênicos e os agentes promotores da carcinogênese

nese estão envolvidos nos diferentes estágios de desenvolvimento dos papilomas e carcinomas. Dois estágios da carcinogênese – a iniciação e a promoção – que apresentam componentes independentes já foram descritos.

Como a maior parte dos papilomas não progride para o câncer e o desenvolvimento maligno somente ocorre após longo período de latência, a infecção viral é considerada como condição necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento dos diferentes tipos de neoplasias epiteliais associados com os papilomavírus. O papiloma é um tumor benigno, mas as alterações displásicas ocasionadas pelo vírus podem originar a lenta progressão para uma doença maligna.

9 Diagnóstico

A maioria das viroses pode ser diagnosticada por técnicas tradicionais de Virologia, como os cultivos celulares, a microscopia eletrônica ou a sorologia. Entretanto, nenhum desses métodos é rotineiramente utilizado para a detecção do papilomavírus.

A histologia possibilita a identificação de neoplasia intra-epitelial, que pode estar associada com vírus de potencial oncogênico e que são de risco para a progressão do câncer. Por meio da histologia, não é possível identificar o tipo de papilomavírus associado com o efeito citopático. A interpretação histológica é também dificultada quando as alterações vírus-associadas são mínimas, além de não permitir a identificação de infecção latente.

A técnica de imunoistoquímica é um método com baixa sensibilidade e especificidade e que exige a presença de grande concentração de proteínas virais. Apesar de ainda estar sob avaliação, a sorologia para o diagnóstico de rotina do HPV tem mostrado algumas vantagens. No momento, a técnica de VLP-ELISA (ensaio imunoenzimático com partículas semelhantes a vírus) ainda apresenta baixa especificidade e sensibilidade.

A impossibilidade do cultivo dos papilomavírus em sistemas *in vitro* de cultivos celulares tem direcionado o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico baseadas na identificação do DNA viral. As principais técnicas utilizadas para

a detecção do papilomavírus são: a hibridização do ácido nucléico e a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Diferentes métodos de hibridização foram desenvolvidos para a detecção do DNA do papilomavírus em fragmentos de tecidos e em esfregaços. O limiar de detecção é variável e, em sua maioria, esses métodos apresentam baixa sensibilidade e especificidade. A técnica de *Southern blot* é considerada o “padrão ouro” para a detecção do genoma do papilomavírus. Esse método é um valioso instrumento de pesquisa, mas não tem aplicação para a rotina diagnóstica. Algumas variações de métodos de hibridização já foram utilizadas para a detecção do DNA do papilomavírus, como o *Dot blot*, a hibridização *in situ*, a hibridização *in situ* com filtro, entre outras. Porém, todas essas técnicas somente detectam infecções com mais de 10 a 20 cópias do genoma viral por célula e também não são utilizadas na rotina diagnóstica.

A PCR tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico e caracterização molecular dos papilomavírus com bons níveis de sensibilidade e especificidade. A PCR possibilita ainda que os produtos amplificados sejam avaliados por análises do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) e, mais comumente, por sequenciamento, permitindo, assim, a elaboração de análises filogenéticas. Segmentos do gene L1 são os mais utilizados para a amplificação tanto com o objetivo de diagnóstico quanto para a caracterização molecular de novas espécies e tipos virais.

10 Imunologia

As lesões benignas produzidas na infecção cutânea e mucosa pelo papilomavírus apresentam tendência de regressão espontânea. No entanto, algumas infecções com curso clínico prolongado e que determinam lesões extensas podem, ocasionalmente, progredir para o câncer.

Infecções pelo papilomavírus, ocasionando lesões benignas, podem ser encontradas tanto em animais imunossuprimidos quanto imunocompetentes. Casos de papilomatose persistente geralmente são observados em animais imunossuprimidos. Um grande número de animais com

papilomatose em um rebanho pode estar relacionado com fatores químicos ou mecanismos imunomodulados, que podem ativar o vírus latente. A relação entre o número de células CD4+ e CD8+ no sangue periférico de animais infectados com o papilomavírus é significativamente menor quando comparada com animais não-infectados, sugerindo uma depleção linfocitária.

A maior susceptibilidade de animais jovens à infecção pelo papilomavírus deve-se à falta de reconhecimento do patógeno pelo sistema imune. Após a infecção primária, os animais tornam-se menos susceptíveis ou mesmo resistentes a novas infecções.

A regressão e o desaparecimento de lesões benignas apresentam evidências do desenvolvimento de imunidade sistêmica, uma vez que todas ou a maioria das lesões regredem simultaneamente. Após o desaparecimento das lesões, ocorre um período de resistência à reinfecção pelo mesmo tipo viral que ocasionou as lesões. Entretanto, outro tipo viral pode produzir nova infecção com a produção de lesões. A imunidade à reinfecção é mediada por anticorpos neutralizantes produzidos contra as proteínas do capsídeo viral, principalmente contra a proteína L1. A imunidade humoral tem importância na prevenção de infecção, mas não é efetiva para a regressão das lesões.

Anticorpos contra as proteínas iniciais E1 e E2 (encontradas no início da infecção e responsáveis pelos eventos primários da replicação viral) e contra E6 e E7 (que são proteínas envolvidas na transformação celular), são detectados em diferentes estágios da infecção. Os anticorpos contra E1 e E2 permanecem constantes e os anticorpos contra E6 e E7 declinam mais tardiamente.

A regressão dos papilomas se deve a eventos celulares da imunidade, onde são encontrados infiltrados de linfócitos T nas lesões em processo de regressão. Os tipos celulares (CD8+/CD4+), predominantes nas diferentes camadas celulares do epitélio, podem variar de acordo com o tipo de papilomavírus envolvido na infecção.

Por fim, deve-se, ainda, considerar que aspectos genéticos, nutricionais e imunológicos relacionados ao hospedeiro e características pró-

prias de cada tipo viral podem influenciar na forma de manifestação clínica e na evolução da infecção pelo papilomavírus, bem como no processo de recuperação do animal infectado.

11 Imunoprofilaxia

As pesquisas de vacinas contra o papilomavírus são prejudicadas pela incapacidade do vírus de replicar em cultivos celulares e também pela dificuldade de adaptação em cultivos de tecidos. Os primeiros estudos realizados com vacinas contra os diferentes tipos de papilomavírus bovino foram realizados na década de 1990, quando se sugeriu a existência de imunidade tipo-específica para esse vírus.

Sucessos na profilaxia e na regressão de tumores epidermais e do trato digestório foram obtidos em bovinos, tanto utilizando vacinas convencionais quanto vacinas produzidas por engenharia genética. Inicialmente, dois tipos de vacinas foram considerados: vacinas profiláticas, que induziriam anticorpos vírus-neutralizantes prevenindo a infecção, e vacinas terapêuticas, que promoveriam a regressão das lesões já estabelecidas, antes que a progressão maligna tivesse início.

Diferentes estratégias para a elaboração de vacinas têm sido utilizadas para o controle da infecção pelo papilomavírus, destacando-se entre elas: a) vacina autógena, preparada a partir de macerado de papilomas cutâneos do animal de origem. Esse tipo de vacina tem sido utilizado em bovinos, caninos e coelhos, e experimentos controlados indicam um efeito positivo na regressão das lesões; b) extratos heterólogos de papilomas cutâneos, semelhantes a vacinas autógenas, preparados a partir de lesões obtidas de diversos animais; c) vacina de vírus purificado. Este foi o primeiro tipo de vacina testada em bovinos e protege contra subseqüentes desafios com vírus homólogos; d) proteínas recombinantes expressas em bactérias induzem a formação de anticorpos neutralizantes produzidos contra epitopos conformationais. Como vacina profilática, utiliza-se a proteína L1 do capsídeo viral; e, para a regressão tumoral, são utilizadas as proteínas iniciais E1, E2, E6 e E7. Para o BPV-4, a vacina com a proteína

L2 promove a regressão tumoral, provavelmente por estimular a resposta imune do hospedeiro a outras proteínas virais; e) proteínas recombinantes produzidas em sistema baculovírus também podem ser utilizadas como vacinas induzindo resposta imune celular; f) VLPs, produzidas a partir da expressão dos genes L1 ou L1 e L2 em bactérias. A proteína L1 de forma isolada ou a associação das proteínas L1 e L2, expressas a partir de células bacterianas recombinantes, produzem, por afinidade química, o capsídeo viral e induzem a formação de anticorpos neutralizantes; g) vacina de DNA. Fragmentos de DNA plasmidial, codificando antígenos virais, são bombardeados juntamente com partículas de ouro diretamente no núcleo celular. Podem ser utilizados somente os genes L1 e E6 ou a sua associação com os genes iniciais E1, E2, E6 e E7, que apresenta maior eficiência. A imunidade induzida por essa vacina pode ser longa.

12 Doenças de importância em medicina veterinária causadas por papilomavírus

12.1 Papilomatose

A papilomatose cutânea é caracterizada pela formação de tumores benignos no epitélio cutâneo e mucoso de várias espécies animais, destacando-se as domésticas (bovinos, ovinos, suínos, eqüinos e caninos), de laboratório (coelhos e *hamsters*), selvagens (ursos, alces), mamíferos aquáticos (golfinhos, peixes-boi), outros animais aquáticos (tartarugas marinhas), aves (papagaios) e também os seres humanos.

A papilomatose cutânea geralmente acomete indivíduos jovens e/ou imunocomprometidos. Os papilomas cutâneos podem ser encontrados em diversas localizações anatômicas e com os mais variados tamanhos e morfologias, incluindo desde papilomas planos até em forma de “grão de arroz” e “couve-flor”.

A papilomatose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa de grande importância na pecuária mundial, tanto para as explorações leiteiras quanto de corte. A enfermidade pode causar

prejuízos econômicos consideráveis, destacando-se a redução no consumo de alimentos e consequente perda de peso e/ou queda na produção de leite, predisposição a mastites e a outras infecções secundárias e redução na qualidade do couro. Os prejuízos estão intimamente relacionados com a localização anatômica e extensão das lesões encontradas. Surtos de papilomatose cutânea bovina com prevalências variadas são relatados em diversos estados brasileiros.

O BPV-1 causa fibropapilomas em tetos, pênis e em outras localizações anatômicas; o BPV-2 também causa fibropapilomas em diversas localizações anatômicas, inclusive no esôfago e rúmen. Além disso, é responsável pelo desenvolvimento de papilomas cutâneos comuns. Em associação com a ingestão crônica de samambaia (*Pteridium aquilinum*), o BPV-2 também é implicado na etiologia da hematúria enzoótica bovina; o BPV-3 tem sido isolado de papilomas cutâneos comuns; o BPV-4 também é isolado de lesões cutâneas e, quando em associação ao consumo crônico de samambaia, pode causar tumores no trato digestório superior, popularmente conhecidos como “caraguatá”; o BPV-5 causa fibropapilomas em forma de grão de arroz no úbere e tetos; e o BPV-6 também é o agente etiológico de papilomas localizados na glândula mamária. Em 2007, no Japão, foram descritos dois novos tipos de BPV (BPV-7 e BPV-8) em lesões cutâneas, ainda não classificados em nível de espécie.

A papilomatose eqüina é um distúrbio dermatológico não muito comum, causada pelo papilomavírus eqüino tipo 1 (EqPV-1). A infecção é geralmente autolimitante e caracterizada por pequenas lesões localizadas na região da cabeça e pescoço. Mais comum que a papilomatose cutânea em eqüinos é a infecção heteróloga de eqüinos com o BPV-1 ou BPV-2, resultando na produção do sarcóide eqüino. Essa infecção, mesmo não sendo produtiva, promove o aparecimento de grandes massas tumorais. O tratamento pode ser realizado por extirpação cirúrgica ou com produtos imunoestimulantes, tais como a aplicação intralesional de BCG. A papilomatose ovina, causada pelo OvPV-1 e OvPV-2, não é uma doença de importância econômica, ocorre em uma pequena parcela da população ovina e não provoca lesões extensas.

A papilomatose suína ocorre com maior frequência na bolsa escrotal e interfere com a libido, tanto pela dor localizada quanto pela presença de aderências. O agente etiológico da papilomatose suína ainda não foi caracterizado.

A papilomatose canina pode ser encontrada sob duas formas. A primeira e mais importante é a forma oral, conhecida como papilomatose oral canina. Essa forma é ocasionada pela infecção com o COPV, e caracteriza-se pelo aparecimento de pequenos papilomas pedunculados (1-2 cm de comprimento) na cavidade oral, podendo estender-se desde a gengiva até o palato. Os animais podem apresentar também lesões ao redor da boca e olhos. As implicações dessa forma de papilomatose são: a dificuldade de alimentação e o mal-estar. A segunda forma, menos comum, é a papilomatose cutânea propriamente dita, causada pelo CPV-1. Essa infecção pode causar lesões, geralmente em pequeno número, distribuídas em várias regiões do corpo do animal.

12.2 Hematúria enzoótica e tumores no trato digestório superior de bovinos

Historicamente, a etiologia da hematúria enzoótica bovina foi relacionada a diversos fatores, incluindo deficiências nutricionais, ingestão de plantas tóxicas, falta ou excesso de molibdênio no solo e agentes infecciosos, como bactérias (*Corynebacterium renale*), fungos (*Fusarium* spp), protozoários e até endoparasitos. Atualmente, a interação do papilomavírus bovino tipo 2 com carcinógenos presentes na planta samambaia (*Pteridium aquilinum*) é reconhecida mundialmente como a mais provável causa da hematúria enzoótica bovina.

A hematúria enzoótica bovina apresenta caráter enzoótico em determinadas regiões geográficas que reúnem condições ideais para o crescimento da samambaia. Essa planta invasora se desenvolve em solos pobres, ácidos, com baixos teores de cálcio e de fósforo e em regiões com umidade relativa do ar elevada. A samambaia é uma pteridófita do gênero *Pteridium*, espécie *aquilinum*, e, no Brasil, é encontrada apenas a subespécie *caudatum*, variedade *arachnoideum*.

A samambaia é cosmopolita em todas as regiões tropicais e, no Brasil, sua presença é registrada em praticamente todos os estados.

A samambaia apresenta em sua composição diversas substâncias mutagênicas, carcinogênicas e imunossupressivas. A toxicidade da planta é comprovada experimentalmente, no entanto, a sua associação com a patogenia dos tumores vesicais e do trato digestório ainda não está totalmente esclarecida. Substâncias potencialmente mutagênicas e/ou carcinogênicas foram isoladas da samambaia, incluindo a quercetina, ptaquilosídeos, α -ecdysone, ácido shikímico, aquilídeo A, tanino, prunasina e camferol. A carcinogenicidade da planta tem sido atribuída à quercetina, ácido shikímico e ao ptaquilosídeo. Porém, a baixa frequência de atividade citotóxica desses compostos sugere que não sejam os prováveis agentes etiológicos diretos na intoxicação pela samambaia em bovinos. A natureza dos carcinógenos não foi completamente elucidada e nenhum dos constituintes tóxicos isolados foi capaz de reproduzir, individualmente, todas as síndromes típicas dessa intoxicação. Apesar da baixa palatabilidade, são várias as condições em que a intoxicação natural pela samambaia pode ocorrer, como pela ingestão de fenos contaminados, superpastoreio, secas, geadas ou queimadas e a necessidade da ingestão de fibras. A intoxicação pela samambaia em bovinos pode apresentar três formas clínicas: intoxicação aguda, hematúria enzoótica crônica e tumores no trato digestório superior.

A hematúria enzoótica é caracterizada pela presença de sangue na urina. As primeiras manifestações ocorrem em animais adultos, com idade superior a três ou quatro anos, sem preferência de raça ou de sexo. A doença evolui devido às crises de hematúria, associadas à poliúria e disúria, intercaladas por períodos de remissão, que podem perdurar semanas, meses ou mesmo anos. A fase da hematúria é variável, o volume de sangue perdido é inconstante, e os animais também podem apresentar acentuada proteinúria. Em algumas situações, a hematúria enzoótica bovina pode ocorrer em associação com neoplasias do trato alimentar.

Os tumores do trato digestório superior obstruem a passagem de alimentos e, no exame

clínico, são observados sinais de disfagia, regurgitação, dilatação do esôfago proximal à massa tumoral, perda de peso e timpanismo crônico recidivante. A ocorrência desses tumores, embora de etiologia não confirmada experimentalmente, tem sido atribuída à ingestão da samambaia, com uma possível associação etiológica com o BPV-4. Uma porcentagem significativa dos animais com lesões do trato digestório superior também apresenta lesões neoplásicas na bexiga urinária.

Várias observações sobre a ocorrência do papilomavírus bovino e carcinomas no trato digestório superior de bovinos, associados com sinais de hematúria enzoótica e com ingestão da samambaia, já foram relatadas no Brasil e em outros países. As toxinas da samambaia foram capazes de produzir tumores em animais de laboratório livres da infecção pelo vírus, e este, isoladamente, foi capaz de produzir neoplasias na bexiga de bezerros que não tinham acesso à samambaia. Resultados de vários experimentos confirmaram que tanto o vírus quanto a samambaia estão envolvidos na carcinogênese da bexiga.

O efeito clastrogênico dos componentes da samambaia tem sido avaliado *in vitro* e *in vivo*. No entanto, a contribuição potencial da clastrogenicidade do papilomavírus ainda não foi esclarecida. A análise citogenética de células do sangue periférico de animais alimentados em pastos infestados com samambaia demonstra um aumento significativo na frequência de aberrações na estrutura dos cromossomos, quando comparados com animais em pastos não infestados. Como os linfócitos são células-alvo da infecção latente do papilomavírus, sugere-se que o vírus possa contribuir para a produção de anormalidades cromossômicas nessas células.

Não se conhece um tratamento efetivo para esses distúrbios, porém a retirada dos animais dos pastos infestados com a planta pode propiciar uma lenta recuperação, desde que não existam lesões neoplásicas em estágios avançados de evolução.

Possibilidades de imunoprofilaxia contra o BPV-2 e o BPV-4 para o controle e prevenção da hematúria enzoótica bovina e de tumores no trato digestório superior estão sendo desenvolvidas e avaliadas. Porém, resultados conclusivos ainda não foram produzidos.

13 Bibliografia consultada

- BLOCH, N. et al. Identification of papillomavirus in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communication**, v.21, p.63-68, 1997.
- BORZACCHIELLO, G. et al. Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. **The Journal of General Virology**, v.84, p.2921-2926, 2003.
- BORZACCHIELLO, G. et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor beta receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. **Oncogene**, v.25, p.1251-1260, 2006.
- CAMPO, M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v.89, p.249-261, 2002.
- CAMPO, M.S. Review: bovine papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, v.154, p.175-188, 1997.
- CAMPO, M.S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends in Microbiology**, v.3, p.92-97, 1995.
- CAMPO, M.S. Cell transformation by animal papillomaviruses. **The Journal of General Virology**, v.73, p.217-222, 1992.
- CAMPO, M.S. et al. Latent papillomavirus infection in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.56, p.151-157, 1994.
- CAMPO, M.S.; JARRETT, W.F. Vaccination against cutaneous and mucosal papillomavirus in cattle. **Ciba Foundation Symposium**, v. 187, p.61-73, 1994.
- CAMPO, M.S. et al. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, v.52, p.6898-6904, 1992.
- CHOW, L.T.; BROKER, T.R. Small DNA tumor viruses. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.12, p.267-301.
- FRAZER, I.H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature Reviews. Immunology**, v.4, p.46-54, 2004.
- FREITAS, A.C. et al. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.76-78, 2003.
- FAUQUET, C.M. et al. (Eds). **Virus taxonomy**, VIIIth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. 2.ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. 1162p.
- GAUKROGER, J.M. et al. Interaction between bovine papillomavirus type 4 and cocarcinogens in the production of malignant tumours. **The Journal of General Virology**, v.74, p.2275-2280, 1993.
- HOPKINS, N.C. Aetiology of enzootic haematuria. **The Veterinary Record**, v.118, p.715-717, 1986.

- JARRET, W.F. et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types. **The Veterinary Record**, v.126, p.473-475, 1990.
- JARRETT, W.F. et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. **Virology**, v.184, p.33-42, 1991.
- NICHOLLS, P.K.; STANLEY, M.A. The immunology of animal papillomaviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, p.101-127, 2000.
- OGAWA, T. et al. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **The Journal of General Virology**, v.85, p.2191-2197, 2004.
- OLSON, C.; PAMUKCU, A.M.; BROBST, D.F. Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumors. **Cancer Research**, v.25, p.840-849, 1965.
- OLSON, C. et al. A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. **Cancer Research**, v.19, p.779-783, 1959.
- ONIONS, D. Papillomaviruses: progress for human and veterinary medicine. **Veterinary Journal**, v.154, p.171-172, 1997.
- OTTEN, N. et al. DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. **Archives of Virology**, v.132, p.121-131, 1993.
- STOCCO DOS SANTOS, R.C. et al. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **The Journal of General Virology**, v.79, p.2127-2135, 1998.
- TEIFKE, J.P.; WEISS, E. Detection of bovine papillomavirus DNA in equine sarcoids using the polymerase chain reaction. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v.104, p.185-187, 1991.
- VILLIERS, E.M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v.324, p.17-27, 2004.
- WOSIACKI, S.R. et al. Semi-Nested-PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virological Methods**, v.126, p.215-219, 2005.
- WOSIACKI, S.R. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.635-638, 2006.
- WOSIACKI, S.R. et al. Papilomavírus bovino tipo 2 na etiologia da hematúria enzoótica. **Semina: ciências agrárias**, v.23, p.121-130, 2002.
- WOSIACKI, S.R. **Papilomavírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia pela polimerase e estudo histopatológico**. 2002. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Estadual de Londrina, 2002.
- WOSIACKI, S.R. **Diagnóstico e aspectos moleculares do papilomavírus bovino tipo 2 em rebanhos bovinos com hematúria enzoótica**. 2005. 117f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) -Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Estadual de Londrina, 2005.

1 Introdução	415
2 Classificação	415
3 Estrutura do vírion e do genoma	417
4 Replicação	419
5 O ciclo replicativo	419
6 Adenovírus de interesse veterinário	421
6.1 Adenovírus canino	421
6.1.1 Adenovírus canino tipo 1	422
6.1.2 Adenovírus canino tipo 2	426
6.2 Adenovírus bovino	427
6.3 Adenovírus eqüino	427
6.4 Adenovírus de ruminantes silvestres	428
6.5 Adenovírus aviários	428
6.5.1 <i>Aviadenovirus</i>	428
6.5.2 <i>Siadenovirus</i>	428
6.5.3 <i>Atadenovirus</i>	429
7 Bibliografia consultada	430

1 Introdução

A família *Adenoviridae* abriga um grupo de vírus icosaédricos grandes, sem envelope, com genoma DNA de fita dupla linear. A denominação dessa família originou-se do primeiro vírus do grupo, que foi isolado a partir de explantes de glândulas adenóides humanas em 1953. No ano seguinte, o primeiro adenovírus de interesse veterinário foi isolado de casos de hepatite canina. Desde 2002, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) classifica os membros da família em quatro gêneros: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* e *Siadenovirus*.

A partir do primeiro isolado, o vírus serviu de modelo para estudos de composição e organização estrutural dos capsídeos com simetria icosaédrica. Além disso, os adenovírus também foram os primeiros modelos para a descrição das interações entre vírus e receptores celulares, em estudos de cristalografia.

O conhecimento acerca da estrutura e organização dos vírions e do genoma favoreceu a utilização desses vírus como vetores de expressão e viabilizou a produção de vírus quiméricos, em esforços para o desenvolvimento de vacinas não-convencionais, assim como para a terapia gênica. Além disso, esses conhecimentos impulsionaram o desenvolvimento de métodos baseados em DNA desnudo, pois foi demonstrado que o sucesso desta abordagem estava associado com a eficiência da introdução artificial do genoma nas células hospedeiras. A exemplo do primeiro isolado, a maioria dos adenovírus está envolvida em infecções respiratórias, mas esses vírus podem também estar associados com infecções do trato digestivo, de células parenquimatosas do fígado e de células endoteliais, com diferentes níveis de patogenicidade em várias espécies.

Alguns membros da família possuem impacto na medicina veterinária. Como exemplo, pode-se citar o adenovírus canino (CAV), que apresenta dois representantes: o CAV-1 e o CAV-2. O primeiro é o agente causal da hepatite infecciosa canina, e o segundo está envolvido na etiologia de uma doença respiratória multicausal, conhecida como tosse dos canis. Além destes,

os adenovírus produzem perdas importantes na avicultura. A síndrome da queda de postura, a enterite hemorrágica dos perus, a bronquite das codornas, entre outras, são exemplos de enfermidades provocadas por adenovírus nas aves.

2 Classificação

Seguindo os critérios de classificação preconizados pelo ICTV, os adenovírus são agrupados de acordo com várias características, que incluem a morfologia do vírion, estrutura e organização do genoma, replicação, reatividade antigênica e propriedades biológicas. São reconhecidos quatro gêneros na família *Adenoviridae*: *Mastadenovirus* (com 25 espécies, das quais 20 oficialmente aceitas e cinco em estudo), *Aviadenovirus* (nove espécies, seis aceitas), *Atadenovirus* (sete espécies, uma aceita) e *Siadenovirus* (duas espécies). Várias dessas espécies apresentam isolados que podem ser diferenciados entre si em sorotipos, de acordo com a reatividade sorológica.

Uma lista das espécies já descritas em animais está apresentada na Tabela 16.1. Existe um consenso, no entanto, que essa lista é provavelmente subestimada, com base no número de isolados já identificados em humanos. Seis espécies de adenovírus já foram descritos em humanos (adenovírus humano tipo A até F), abrangendo mais de 50 sorotipos.

As características genômicas e antigênicas podem ser complementares e, algumas vezes, resultam em novas classificações e agrupamentos de vírus, inclusive em novos gêneros, como o *Atadenovirus* e *Siadenovirus*. O gênero *Atadenovirus*, que possui como protótipo o adenovírus ovino 287 (adenovírus ovino tipo D) foi criado, agrupando também vírus de bovinos anteriormente classificados como *Mastadenovirus* e com vírus de origem aviária, como o vírus da síndrome da queda de postura (adenovírus de patos tipo A), classificado anteriormente como *Aviadenovirus*. Essa nova classificação é baseada principalmente em diferenças na organização genômica e na similaridade do gene que codifica a proteína *hexon* desses vírus.

Tabela 16.1. Adenovírus associados com enfermidades em animais

	Vírus	Abreviatura	Enfermidade/hospedeiro
Gênero Mastadenovirus <i>Protótipo Adenovirus humano C (HAdV-C)</i>	Adenovirus bovino (3 espécies)	BAdV-A, BAdV-B, BAdV-C	Infecção subclínica ou doença respiratória leve em bovinos
	Adenovirus canino	CAdV-1	Hepatite infecciosa canina
		CAdV-2	Traqueobronquite infecciosa (tosse dos canis) em cães
	Adenovirus eqüino (2 espécies)	EAdV-A, EAdV-B	Infecção subclínica ou doença respiratória leve. Broncopneumonia e doença generalizada com imunodeficiência em eqüinos
	Adenovirus ovino (3 espécies)	OAdV-A, OAdV-B, OAdV-C	Infecção subclínica ou doença respiratória leve em ovinos
	Adenovirus suíno (3 espécies)	PAdV-A, PAdV-B, PAdV-C	Infecção subclínica ou doença respiratória leve em suínos
	Adenovirus caprino (Proposto)	GAdV-A	Infecção subclínica ou doença respiratória leve em caprinos
Gênero Aviadenovirus <i>Protótipo Adenovirus aviário A (FAdV-A)</i>	Adenovirus aviário (5 espécies)	FAdV-A, FAdV-B, FAdV-C, FAdV-D, FAdV-E	Hepatite, doença respiratória em galinhas
	Adenovirus de gansos	GoAdV	Isolado de fígado e intestino de gansos
Gênero Atadenovirus <i>Protótipo Adenovirus ovino D (OAV-287)</i>	Adenovirus bovino (2 espécies)	BAdV-D, BAdV-E	Infecção assintomática ou doença respiratória em bovinos
	Adenovirus cervídeo	DeAdV	Edema pulmonar, hemorragia e vasculite em veados
	Adenovirus de patos A	DAdV-A	Hepatite em patos e síndrome da queda de postura em galinhas
	Adenovirus ovino D	OAV-D	Infecção assintomática ou doença respiratória leve em ovinos
Gênero Siadenovirus <i>Protótipo Adenovirus de perus A (TAdV-A)</i>	Adenovirus de perus A	TAdV-A	Enterite hemorrágica em perus e pancreatite em faisões

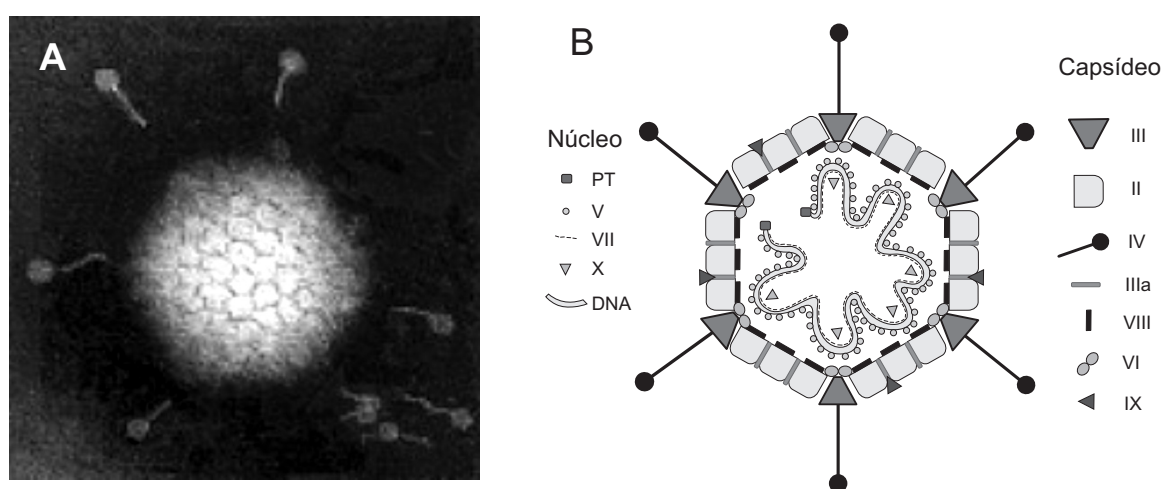
As propriedades sorológicas foram as primeiras utilizadas para a classificação dos adenovírus que apresentam características peculiares. Por exemplo, alguns determinantes antigênicos presentes na região interna dos *hexons* determinaram a classificação em gêneros. Há epitopos presentes nos *pentons*, localizados nos vértices do capsídeo icosaédrico, que também definem a especificidade de gêneros. A classificação em sorotipos é determinada pela reatividade com anticorpos neutralizantes e também com anticorpos inibidores da hemaglutinação. Os epitopos envolvidos com essas propriedades estão localizados na superfície dos hexons e fibras. Uma característica interessante é que anticorpos contra os epitopos localizados na fibra e no seu botão terminal possuem fraca atividade neutralizante. Assim, a determinação estrutural sorológica da família é baseada na dominância relativa de alguns determinantes, dependendo dos testes utilizados, mais do que na sua localização nos vírions.

3 Estrutura do vírion e do genoma

Os adenovírus possuem vírions hexagonais, icosaédricos, sem envelope, com diâmetro apro-

ximado de 80 nm, sem considerar as fibras dos *pentons*. Na Figura 16.1, está apresentada uma representação esquemática dos vírions da família *Adenoviridae*. A composição dos vírions é de aproximadamente 13% de DNA e 87% de proteínas. Os vírions não apresentam membranas lipídicas e, por isso, são resistentes a condições ambientais e a solventes orgânicos. No entanto, a infectividade dos adenovírus pode ser inativada por desinfetantes comuns. Os vírions apresentam densidade de 1,34 g.cm⁻³ em cloreto de céso; são resistentes a vários desinfetantes e podem sobreviver à temperatura ambiente por vários dias em fômites. A infectividade é inativada por água quente (50 a 60°C por mais de cinco minutos) e por desinfetantes à base de iodo, fenol ou hidróxido de sódio.

O capsídeo é constituído por 252 capsômeros, sendo 240 hexons e 12 pentons. Os hexons (trímeros do gene II, 120 kDa) formam as superfícies dos 20 triângulos equiláteros e são associados às proteínas IIIa, IX, VI e VIII. Os vértices desses triângulos são compostos pelos pentons (proteína III, 85 kDa). Em cada vértice, há um prolongamento protéico conhecido como fibra (proteína IV, 62 kDa). Essas projeções apresentam extensão variável entre as espécies de vírus e podem



Fonte: A) Dra Linda Stannard;www.uct.ac.za

Figura 16.1. Estrutura dos vírions da família *Adenoviridae*. A) Microscopia eletrônica de um adenovírus. Representação esquemática de uma partícula vírica com os seus constituintes.

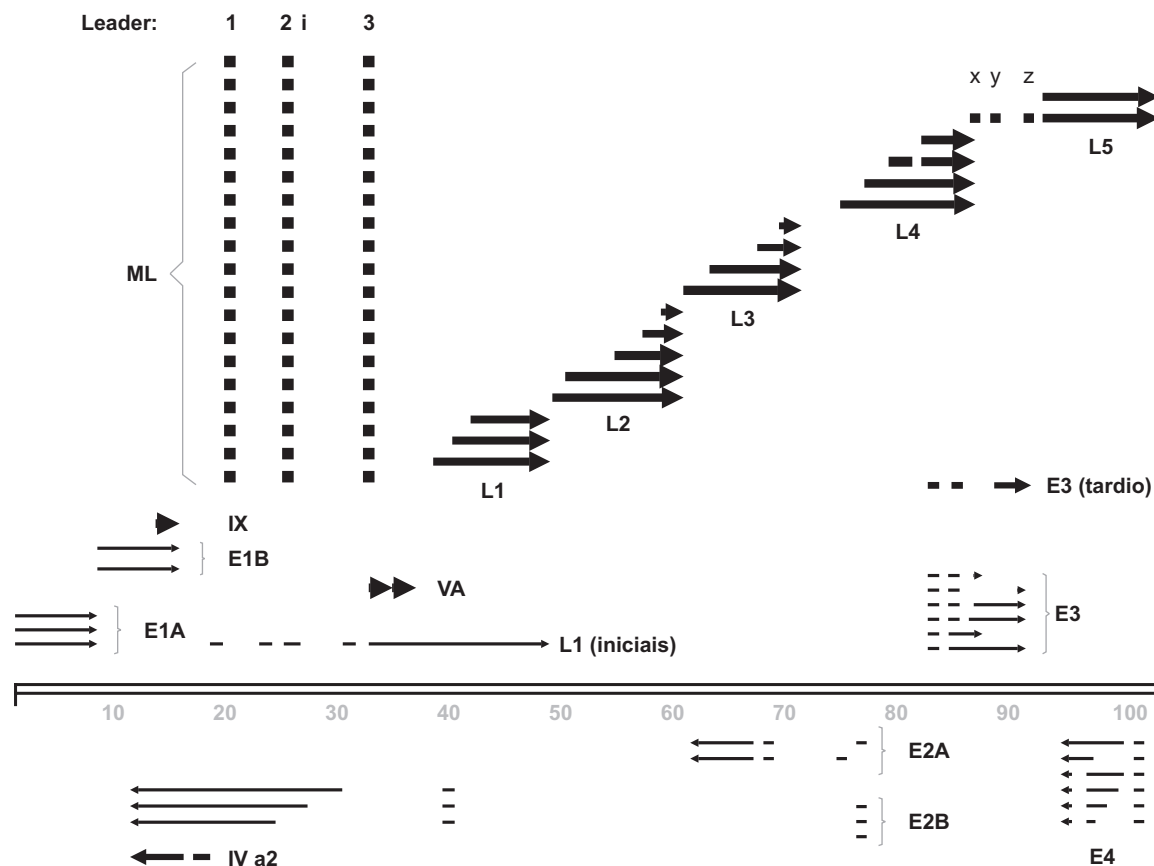
possuir entre 20 e 50 nm. Na porção terminal de cada fibra, há uma pequena estrutura globular formando um botão terminal. Essa extremidade da fibra é responsável pela ligação do vírion aos receptores celulares.

Na região interna do vírion, localiza-se o genoma associado com quatro proteínas (V, VII, X e proteína terminal). As múltiplas cópias das proteínas V (48,5 kDa, 180 cópias) e VII (18,5 kDa, 1070 cópias) apresentam-se conjugadas com o DNA viral e estão envolvidas no empacotamento e compactação do genoma. Em complexos de seis cópias, as proteínas VII são muito similares estruturalmente e funcionalmente aos complexos de histonas da cromatina de eucariotas. A proteína V medeia as interações entre o núcleo e o capsídeo e também se associa aos pentons, estando provavelmente envolvida na localização do

genoma durante a morfogênese das partículas víricas. A proteína terminal (55 kDa) apresenta ligação covalente em cada uma das extremidades 5' do DNA genômico e possui função de *primer* durante a replicação do genoma.

O genoma viral é uma molécula única de DNA de fita dupla linear, com 36 a 44 kbp (1 kpb = 1.000 pares de bases), possuindo entre 48 e 61% de G + C. A transfecção do genoma desprovido de proteínas em células permissivas resulta no ciclo replicativo completo, com formação e liberação de progênie viral infecciosa. Por isso é dito que o genoma dos adenovírus é *infeccioso*.

O genoma codifica aproximadamente 40 proteínas, com genes presentes nas duas cadeias de DNA, transcritos em direções opostas (Figura 16.2). Vários desses genes originam transcritos que são processados pelo mecanismo de *splicing*



Fonte: adaptada de Shenk (2001).

Figura 16.2. Representação gráfica da organização genômica e dos transcritos dos adenovírus. Os transcritos iniciais são designados E (early), e os transcritos tardios são denominados L (late). Cada seta representa um mRNAs diferente produzido a partir da transcrição e processamento dos transcritos primários.

antes de serem exportados para o citoplasma, onde serão traduzidos. Uma mesma região transcrita pode originar diferentes RNAs mensageiros (mRNAs), que são produzidos por clivagem e remoção de seqüências internas (*introns*). A organização genômica e os transcritos primários produzidos pela transcrição dos genes dos adenovírus estão representados na Figura 16.2. O genoma é dividido em 11 regiões de transcrição, baseadas na regulação temporal da expressão, sendo cinco delas iniciais (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas intermediárias (IX e IVa2) e uma tardia (que origina cinco mRNAs – L1 a L5). Destas regiões, os genes iniciais codificam proteínas não-estruturais, e as tardias codificam proteínas estruturais.

4 Replicação

Os adenovírus possuem representantes em várias espécies de hospedeiros. A replicação do genoma desses vírus ocorre no núcleo das células hospedeiras e resulta na produção de corpúsculos de inclusão basofílicos. Em geral, a replicação *in vivo* é associada aos sistemas respiratório ou gastrintestinal, mas outros tecidos e células também podem ser envolvidos. A replicação dos adenovírus pode interferir ou modular a resposta imunológica do hospedeiro, podendo resultar em infecções persistentes e oportunistas.

Vários adenovírus são capazes de produzir tumores quando inoculados experimentalmente em *hamsters* recém-nascidos, porém ainda não foram descritos como agentes de tumores em seus hospedeiros naturais. Os adenovírus geralmente replicam em altos títulos em células primárias e linhagens celulares, independentemente da fase do ciclo celular. A replicação é acompanhada por alterações na fisiologia celular e produção de efeito citopático (ecp), culminando com a lise celular, que é necessária para a liberação dos vírions.

As linhagens celulares utilizadas para amplificação dos adenovírus *in vitro* geralmente são espécie-específicas. O CAdV replica em células da linhagem MDCK (*Madin Darby canine kidney*); enquanto o adenovírus eqüino é amplificado em células primárias de rim, pulmão e ovário de eqüinos. O vírus da síndrome de queda de postura de galinhas (adenovírus de patos tipo A) re-

plica em células de embrião de pato, hospedeiro natural do vírus. Os vírus isolados de perus e faisões podem ser cultivados em células de linhagem de pâncreas ou em células linfoblastóides de perus (MDCT-RP19).

5 O ciclo replicativo

A interação inicial dos vírions com a superfície das células-alvo ocorre pela ligação das extremidades globulares das fibras dos pentons com os receptores celulares, que são moléculas de integrinas específicas. Essas integrinas são denominadas receptores de adenovírus e vírus Coxsackie (CAR) e são os receptores para os adenovírus humanos mais estudados. Existem aproximadamente 10^5 moléculas de receptores na superfície de cada célula. A ligação inicial aos receptores é seguida por uma segunda interação, entre a base da proteína penton e um co-receptor presente na membrana plasmática, pertencente à família das integrinas. Uma delas seria a vitronectina.

A internalização do complexo vírion/receptor ocorre por endocitose dependente de clatrina. As vesículas endocíticas são transportadas em direção ao núcleo. Durante o trânsito, ocorre a redução gradativa do pH no interior das vesículas. A redução no pH promove alterações na estrutura da partícula viral, a desintegração do capsídeo e a liberação do genoma associado com proteínas. Há evidências de que o transporte para o núcleo da célula é mediado pelos hexons, que se associariam aos microtúbulos celulares. A desintegração completa das partículas ocorre nas proximidades dos poros nucleares, através dos quais o genoma, ainda associado com algumas proteínas, é translocado para o interior do núcleo. Entre a ligação dos vírions aos receptores até a penetração do genoma no núcleo podem transcorrer aproximadamente duas horas.

A transcrição dos genes virais é realizada pela RNA polimerase II e fatores celulares, que reconhecem múltiplos promotores dos genes iniciais e intermediários, além de um promotor que controla a expressão dos genes tardios. Esses genes estão distribuídos nas duas fitas do DNA genômico do vírus (Ver Figura 16.2).

Os produtos dos genes de expressão imediata (E1A) estão envolvidos no controle do ciclo celular, pela expressão de fatores de transcrição e de replicação do DNA viral, promovendo um ambiente favorável para a replicação do vírus. Nesta região genômica, encontram-se os genes que modulam a resposta imune inata do hospedeiro e o ciclo celular, interferindo na atividade de interleucinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), na produção de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior tipo 1 (MHC-I) ou, ainda, no mecanismo de indução da apoptose. As interações dos adenovírus com as células hospedeiras, especialmente na regulação do ciclo celular e no antagonismo da resposta imunológica, foram tratadas com maior profundidade no capítulo referente à replicação dos vírus DNA (Capítulo 6).

Na região E2, estão presentes os genes cujos produtos estão envolvidos na replicação do DNA viral, como as proteínas de ligação às fitas simples de DNA, que estão associadas aos complexos de replicação; e também a DNA polimerase viral. A proteína precursora da proteína terminal (pTP), que se encontra ligada covalentemente às extremidades do genoma viral, também pertence a este grupo de genes. Acredita-se, ainda, que a pTP também esteja associada ao processo de morfogênese dos vírions.

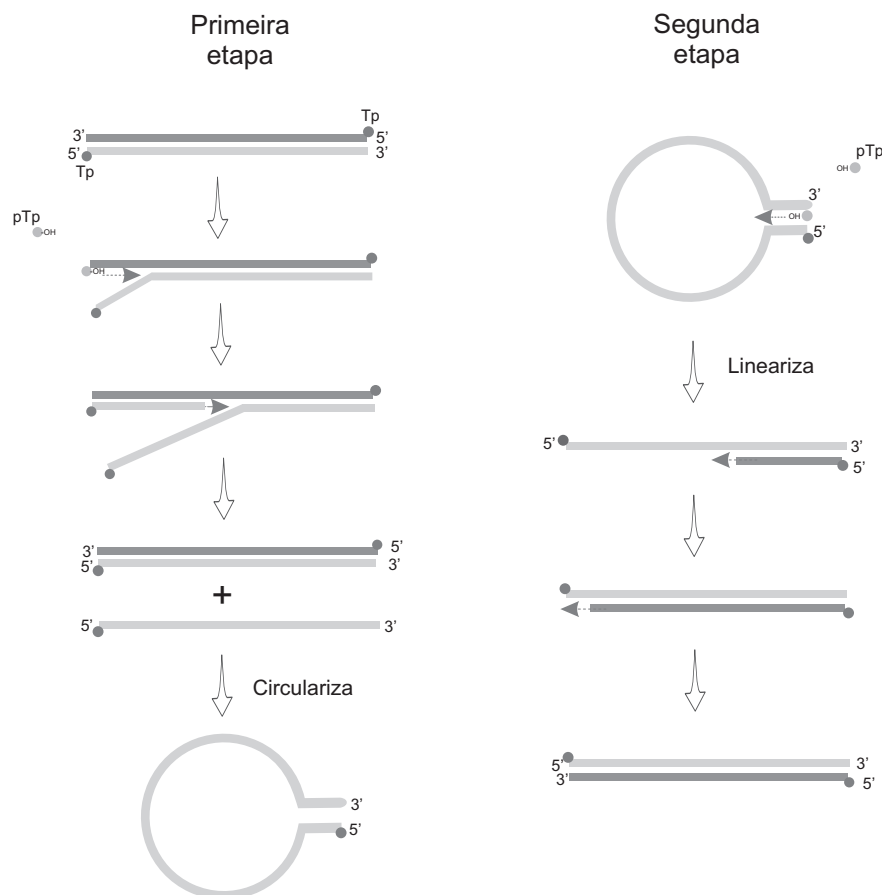
A região E3 do genoma dos adenovírus possui genes que codificam fatores de virulência. Um dos principais produtos é um polipeptídeo de 19 kDa que se liga à cadeia pesada do complexo maior de histocompatibilidade I (MHC-I), provocando a sua retenção em compartimentos intracelulares e reduzindo a sua expressão na superfície celular. Como consequência, ocorre uma redução na capacidade dos linfócitos T citotóxicos reconhecerem e destruírem células infectadas pelos adenovírus. Outro produto dessa região (14,5 kDa) inibe a cascata de eventos ativados pelo fator de necrose tumoral (TNF), que promove a lise de células infectadas. Finalmente, os produtos da região E4 estão envolvidos na regulação da replicação viral e do ciclo celular.

Após a expressão dos genes iniciais, a próxima fase do ciclo replicativo é a replicação do

genoma. Esse processo ocorre com o acúmulo da pTP que se liga às extremidades 5' das cadeias de DNA e serve como iniciador da replicação a partir das regiões terminais. Essa proteína possui um resíduo oxidrila (OH) que serve de substrato para a DNA polimerase viral iniciar a polimerização da cadeia de deoxiribonucleotídeos (dNTPs), formando a nova cadeia de DNA. A replicação das cadeias inicia nas extremidades e ocorre de forma contínua, ao contrário da replicação semi-descontínua do DNA celular, e ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, apenas uma das cadeias é replicada, originando uma molécula de fita dupla. A cadeia restante circulariza, pelo pareamento das regiões repetidas localizadas próximo às extremidades, formando uma estrutura semelhante a um cabo de frigideira (*panhandle*). A DNA polimerase reconhece a extremidade 5' e inicia a síntese da cadeia complementar. Um esquema mostrando as etapas da replicação do genoma dos adenovírus está apresentado na Figura 16.3.

Após a replicação do DNA viral e produção dos transcritos dos genes iniciais e intermediários, a expressão gênica muda para a produção dos transcritos tardios. O controle dessa mudança é complexo, e parece ser dependente do acúmulo de fatores de transcrição, produtos dos genes da região E1A e pela utilização preferencial da fita que codifica os genes tardios. O único promotor dos transcritos tardios é muito eficiente e, por essa característica, é utilizado em vetores de expressão. Ocorre um grande acúmulo de proteínas estruturais e, nesta fase, aproximadamente 20 horas após o início do ciclo viral, ocorre a inibição da síntese de proteínas celulares. Os transcritos tardios são exportados para o citoplasma e, após a tradução nos ribossomos, as proteínas são transportadas até o núcleo, onde participam da montagem dos vírions.

Acredita-se que o genoma associado com proteínas ingresse já em capsídeos pré-formados. Consequentemente, é possível ocorrer a formação de partículas incompletas, sem a presença do genoma. O acúmulo de proteínas virais e a condensação da cromatina celular formam os corpúsculos de inclusão intranucleares que são observados nas células infectadas.



Fonte: adaptada de Flint et al. (2000).

Figura 16.3. Ilustração esquemática da replicação do genoma dos adenovírus. Na primeira etapa, apenas uma das cadeias é replicada, de maneira contínua, a partir de uma das extremidades. A cadeia não-replicada circulariza para a formação de uma nova origem de replicação. A replicação desta cadeia inicia na extremidade e prossegue ao longo da cadeia, que, em seguida, assume a topologia linear. Ao final das duas etapas, as duas cadeias de DNA estão replicadas.

Os vírions recém-formados se acumulam no núcleo celular e a sua liberação depende da morte e lise celular. A morte celular ocorre pela falência de múltiplas funções, principalmente pela interferência do vírus com a expressão de proteínas celulares, que ocorre na fase final do ciclo replicativo. O número de vírions infecciosos produzidos por célula infectada varia para os diferentes adenovírus. Estima-se que sejam produzidas entre 10 e 2.300 partículas totais para cada vírion infeccioso. O ciclo replicativo do adenovírus está representado esquematicamente na Figura 16.4.

6 Adenovírus de interesse veterinário

Os adenovírus geralmente causam infecções inaparentes ou com sinais clínicos leves, autoli-

mitantes e são considerados estritamente espécie-específicos. Alguns adenovírus, porém, são oportunistas e causam infecções em associação com outros agentes, ou servindo como fatores predisponentes para infecções secundárias virais ou bacterianas. Vários adenovírus possuem importância como patógenos de animais.

6.1 Adenovírus canino

Dois tipos de adenovírus canino já foram descritos em cães: os adenovírus canino tipos 1 e 2 (CAV-1 e CAV-2), sendo considerados entre os principais adenovírus de animais. O CAV-1 é o agente etiológico da hepatite infecciosa canina (HIC). A infecção pelo CAV-2 é caracterizada por sinais respiratórios de baixa severidade e

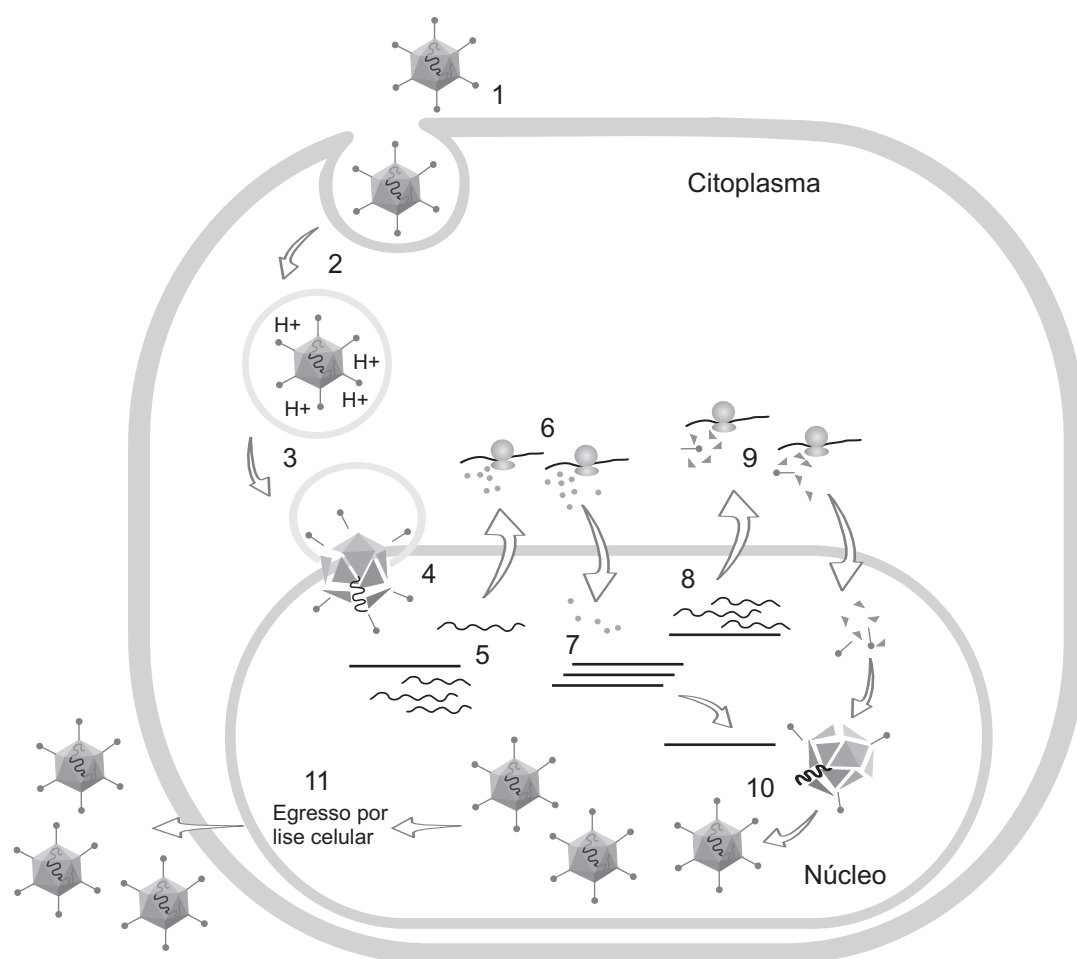


Figura 16.4. Representação esquemática do ciclo de replicação dos adenovírus. O vírion se liga a receptores específicos na membrana plasmática (1) e é internalizado por endocitose mediada por clatrina (2). A acidificação progressiva do interior do endossoma (3) leva à desestruturação da partícula vírica e liberação do genoma próximo aos poros nucleares (4). A translocação do genoma para o núcleo é seguida da transcrição dos genes iniciais (5), cujos mRNAs são traduzidos nos ribossomos (6), resultando em proteínas que atuam na replicação do genoma (7). Após a replicação do genoma, são transcritos os genes tardios (8), cujos mRNAs são traduzidos nas proteínas estruturais (9), que penetram no núcleo e, juntamente com as cópias do DNA genômico recém-produzidas, participam da morfogênese das partículas víricas (10). A progênie viral é liberada por lise celular (11).

este vírus está associado com outros agentes na etiologia da traqueobronquite infecciosa canina (TIC).

6.1.1 Adenovírus canino tipo 1

A hepatite infecciosa canina (HIC) apresenta ocorrência rara em regiões onde a vacinação é realizada regularmente. Entretanto, em populações humanas com condições socioeconômicas baixas, a imunização dos animais de estimação não é uma prática freqüente, o que concorre para uma freqüência maior da infecção. A maioria das infecções pelo adenovírus canino são inaparentes

ou acompanhadas de sinais respiratórios leves. A HIC acomete principalmente animais não-vacinados com idade inferior a seis meses. A doença se apresenta geralmente de forma aguda, e os animais que sobrevivem a essa fase apresentam um prognóstico favorável.

A HIC é causada pelo adenovírus canino tipo 1 (CAdV-1), que pertence ao gênero *Mastadenovirus*. Esse vírus é antigenicamente relacionado com o CAdV-2, agente associado com a traqueobronquite infecciosa ou tosse dos canis. A extensão da reatividade antigênica cruzada pode ser evidenciada pela utilização do CAdV-2 em formulações de vacinas para ambas as enfer-

midades. Essa relação antigênica também pode interferir no diagnóstico, e a diferenciação entre estes dois agentes requer a utilização de anticorpos monoclonais ou técnicas moleculares.

6.1.1.1 Epidemiologia

O vírus é excretado nas secreções e excreções dos cães infectados. A excreção pela urina pode persistir por mais de seis meses após a recuperação clínica, e estes animais são a principal fonte de disseminação do CAdV-1. Os animais susceptíveis adquirem a infecção pelo contato direto, pela via oronasal ou conjuntival; ou indireto, a partir de fômites contaminados. Além dos cães domésticos, as raposas e outros canídeos silvestres são susceptíveis à infecção pelo CAdV-1, e são considerados potenciais reservatórios do vírus.

A infecção pelo CAdV-1 tem sido descrita em vários países europeus, nos EUA e também no Brasil. Acredita-se que esse agente apresente distribuição mundial. No entanto, a utilização massiva de vacinas contra o CAdV a partir da década de 1960, aliada com proteção cruzada por anticorpos decorrentes da infecção natural pelo CAdV-2, têm reduzido a ocorrência de casos da HIC em populações caninas de várias partes do mundo. Estudos prévios ao uso extensivo de vacinas em vários países (Alemanha, países escandinavos, EUA e Japão) demonstraram que a prevalência de anticorpos contra o CAdV variava entre 30 e 60% entre os cães testados. Um estudo sorológico realizado, em 2006, com cães sem histórico de vacinação em Santa Maria, Rio Grande do Sul, revelou 43% (353/817) de amostras positivas.

6.1.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a exposição pela via oronasal ou conjuntival, o vírus replica inicialmente nas tonsilas e nas placas de Peyer, disseminando-se para os linfonodos regionais e, eventualmente, atinge a circulação sanguínea. A fase de viremia ocorre entre o quarto e o oitavo dia após a infecção e resulta na disseminação do vírus para vários ór-

gãos, como o fígado, os rins, o baço e os pulmões. As células parenquimatosas e as células endoteliais do organismo são os alvos principais para a replicação do CAdV-1.

No fígado, são observadas congestão e necrose de coagulação multifocal, com o envolvimento dos hepatócitos da zona três do ácino de Rappaport (região centrolobular) ou necrose lobular generalizada em casos graves. A extensão e a gravidade das lesões hepáticas estão relacionadas com a imunidade humoral. Cães experimentalmente infectados, que possuem títulos baixos de anticorpos (<4), frequentemente desenvolvem insuficiência hepática fulminante, coagulação intravascular disseminada (CID) e vão a óbito (Figura 16.5).

Cães com títulos altos de anticorpos neutralizantes desenvolvem uma infecção clinicamente leve ou inaparente, e podem erradicar o vírus do sangue e do fígado na semana seguinte à infecção. Foi demonstrado que os cães com títulos moderados de anticorpos neutralizantes (entre 16 e 500) podem desenvolver hepatite crônica com infiltrado mononuclear periportal e fibrose progressiva. Nesse mesmo estudo, os animais sobreviventes foram tratados com interferon humano (IFN), resultando na erradicação do vírus do organismo e na resolução das lesões hepáticas. Nas infecções crônicas, o CAdV-1 pode ser identificado somente nos primeiros dias após infecção, o que dificulta o diagnóstico virológico em fases avançadas.

Um estudo retrospectivo por imunohistoquímica e PCR em amostras de fígado de 45 cães com hepatite crônica e cirrose não demonstrou a presença do CAdV-1 ou de produtos virais, questionando a participação do agente na etiopatogenia das hepatites crônicas em cães.

Cães naturalmente infectados e também cães que recebem vacina atenuada (mais raramente) com o CAdV-1 podem desenvolver lesões oculares. Na fase de viremia, o vírus atinge o humor aquoso e replica no endotélio do trato uveal e da córnea, causando uveíte anterior e edema de córnea. À medida que os níveis de anticorpos neutralizantes aumentam, ocorre a deposição de imunocomplexos nos endotélios, ativação do sistema complemento e migração de células inflamatórias, resultando em extravasamento de líquido para o estroma da córnea.

Na fase de viremia, o vírus pode se localizar e replicar nas células do endotélio glomerular e no epitélio dos túbulos renais. A lesão inicial dos glomérulos é causada pela deposição de complexos imunes (complexos antígeno-anticorpos), produzindo glomerulonefrite.

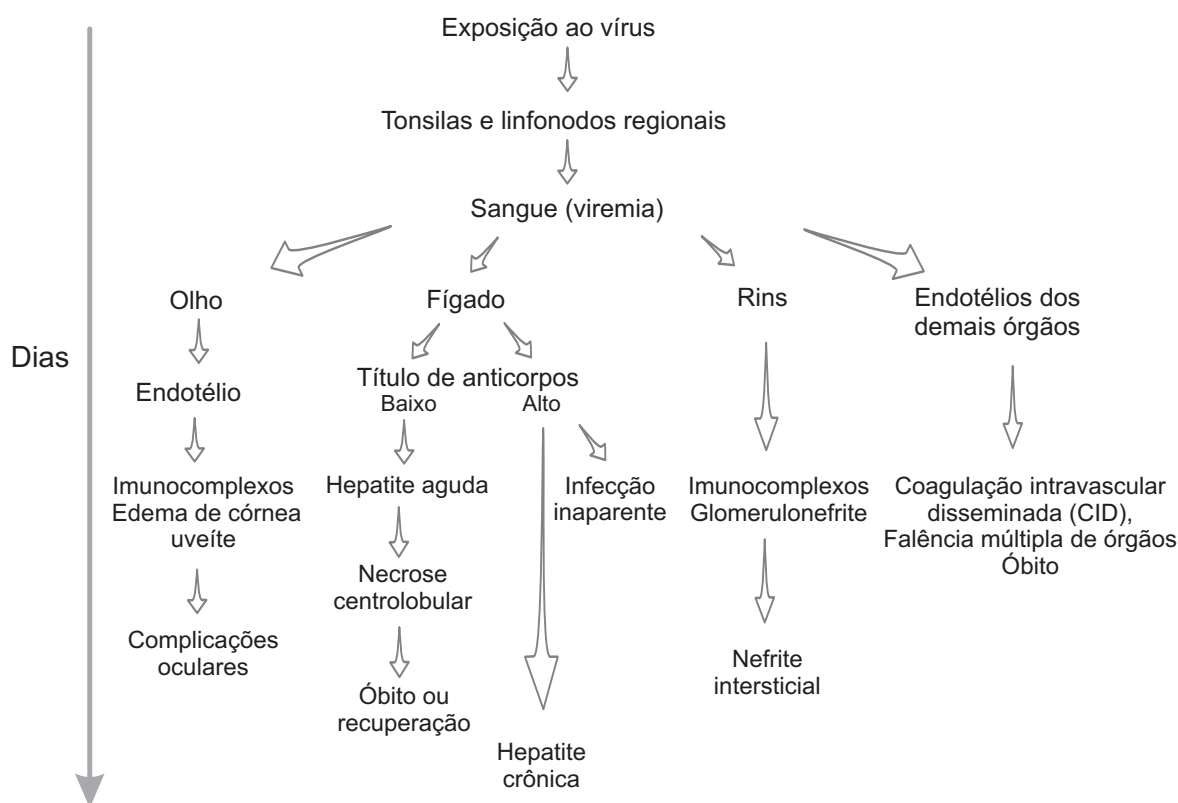
Os cães jovens e não-vacinados são mais susceptíveis à doença. Entretanto, cães de qualquer idade, raça ou sexo podem ser infectados, caso não tenham sido previamente vacinados ou expostos ao agente. A doença pode se manifestar de forma superaguda ou aguda. A hepatite crônica pode ocorrer após a infecção inicial pelo CAHV-1, sem necessariamente ocorrer a manutenção do vírus no fígado.

Os cães com a doença superaguda podem morrer dentro de poucas horas após o surgimento dos sinais clínicos. Os sinais nesta fase incluem apatia, anorexia, palidez das mucosas e petéquias, convulsões e coma. Sinais neurológicos

podem ocorrer e estão associados com hemorragia cerebral.

A forma aguda da doença ocorre com maior frequência. Essa forma é caracterizada por apatia, anorexia, hipertermia, linfadenopatia, taquicardia, taquipnéia, tosse, dor abdominal, hepatomegalia, vômitos, diarreia, edema subcutâneo e diátese hemorrágica. A icterícia não é comum na fase inicial da infecção, porém pode ser pronunciada em cães que sobrevivem à hepatite aguda.

A infecção pelo CAHV-1 pode produzir encefalopatia hepática ou encefalite não-supurativa. A encefalopatia hepática compreende as alterações neurológicas causadas por toxinas de origem gastrointestinal (p. ex.: amônia), que não são metabolizadas adequadamente pelo fígado comprometido. A encefalite não-supurativa é mais rara e geralmente ocorre após a infecção do sistema nervoso central (SNC). Esta forma manifesta-se clinicamente por estupor, ataxia, convulsões e coma.



Fonte: adaptada de Greene (1998).

Figura 16.5. Achados clínicos e laboratoriais em casos de hepatite infecciosa canina. As barras horizontais correspondem à ocorrência cronológica e à duração dos respectivos achados clínicos e laboratoriais.

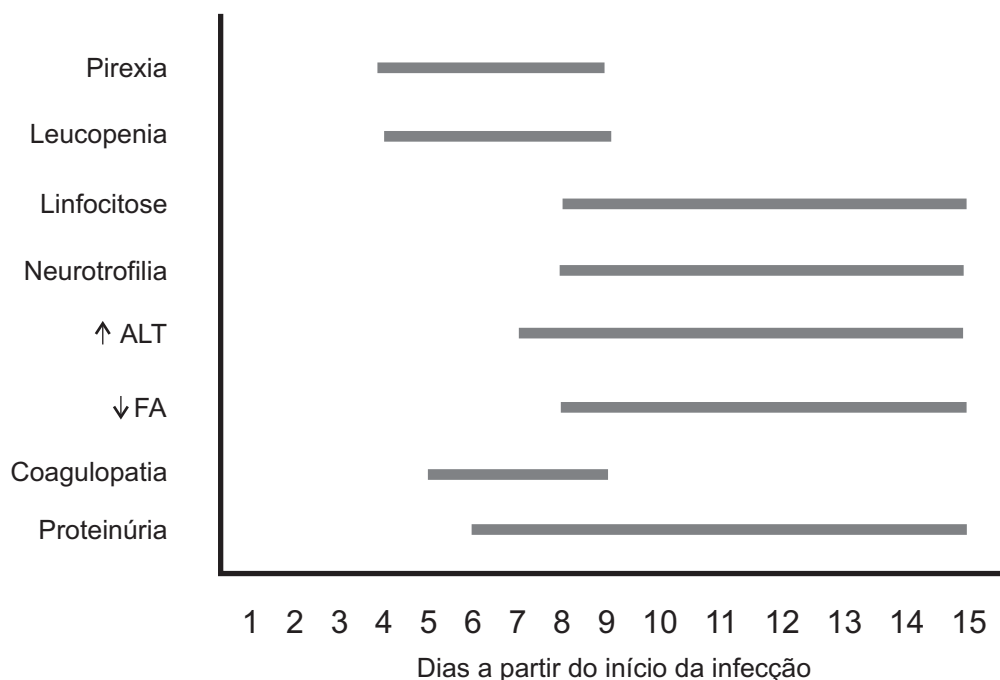
A uveíte anterior e o edema de córnea, também conhecidas como olho azul, podem ser as únicas alterações clínicas observadas em cães com infecções inaparentes (Figura 16.5). O edema de córnea pode ser acompanhado por dor ocular, blefaroespasma e fotofobia. As lesões oculares geralmente são brandas, com resolução espontânea após duas a três semanas. Em casos mais severos, podem ocorrer glaucoma e/ou úlcera de córnea. O surgimento das alterações oculares são um indicativo de que o animal apresenta resposta imunológica contra o vírus, e pode ser considerado um indicativo de bom prognóstico. Essas alterações ocorrem pela deposição de complexos imunes no endotélio vascular do corpo ciliar.

Corpúsculos de inclusão podem ser observados nos tecidos-alvo de replicação viral. As inclusões no núcleo dos hepatócitos são estruturas arredondadas, escuras, circundadas por um halo claro, resultante da migração da cromatina e do nucléolo para a periferia nuclear. As inclusões também podem ser encontradas no encéfalo de cães que morrem com sinais de encefalite e nas células do epitélio tubular renal de cães com nefrite por deposição de complexos imunes.

Os cães com HIC podem apresentar várias alterações na necropsia. Os linfonodos podem estar edemaciados e hemorrágicos. Na cavidade abdominal, pode-se observar líquido de coloração clara ou avermelhada. Petéquias ou equimoses podem ser observadas nas serosas. O fígado geralmente apresenta-se aumentado de volume, escuro, com exsudato fibrinoso depositado sobre a superfície. A icterícia não é observada com frequência em cães que morrem na fase aguda da doença.

6.1.1.3 Diagnóstico

Os achados clínicos e de patologia clínica não são patognomônicos para a hepatite infecciosa canina. Os achados hematológicos iniciais são de leucopenia, neutropenia e linfopenia, pela infecção dos linfonodos e da medula óssea. Durante a fase de recuperação, geralmente ocorrem neutrofilia e linfocitose (Figura 16.6). Trombocitopenia com ou sem alteração da função plaquetária ocorrem frequentemente.



Fonte: adaptada de Greene (1998).

Figura 16.6. Patogenia da hepatite infecciosa canina em ordem cronológica.

Os níveis das enzimas hepáticas e de bilirrubina podem estar elevados, dependendo do grau da necrose do parênquima hepático. Também podem ocorrer proteinúria e bilirrubinúria (Figura 16.6). Na prática clínica, os achados da anamnese dos exames clínicos e laboratoriais podem ser indicativos da enfermidade. Entretanto, o diagnóstico definitivo só pode ser elaborado mediante o isolamento do vírus, a detecção de ácidos nucleicos ou de antígenos virais ou, ainda, pela demonstração dos corpúsculos de inclusão intranucleares.

Dentre as técnicas de diagnóstico utilizadas para a confirmação da infecção pelo CAdV-1 incluem-se o isolamento viral a partir de secreção nasal, urina, sangue e fezes. Após a necropsia, pode-se isolar o vírus dos rins, baço, pulmão, linfonodos e do encéfalo. O isolamento do vírus do fígado é dificultado pela interferência de enzimas hepáticas, como a arginase, que inibe a replicação do vírus nas células de cultivo.

O CAdV replica em células de origem canina, e a linhagem celular mais utilizada é a MDCK (*Madin-Darby canine kidney*). Após o isolamento, deve-se identificar o vírus por imunofluorescência (IFA), imunoperoxidase (IPX) ou PCR. Essas técnicas podem ser realizadas diretamente nas amostras suspeitas, com a possibilidade de diferenciação entre os dois tipos de adenovírus caninos.

A detecção de anticorpos pode ser realizada por testes de ELISA, soroneutralização (SN) e inibição da hemaglutinação (HI), uma vez que o CAdV aglutina eritrócitos de galinha, de perus, de cobaias e de humanos. Não é possível diferenciar-se os anticorpos contra o CAdV-1 daqueles contra o CAdV-2.

6.1.1.4 Controle e profilaxia

Ao contrário de algumas hepatites virais em humanos, a HIC não possui nenhum tratamento específico. Portanto, o tratamento de casos suspeitos ou confirmados é tipicamente de suporte.

Atualmente existem, no mercado brasileiro, vacinas com vírus vivo modificado, contendo o CAdV-2, que conferem imunidade cruzada contra o CAdV-1. Essas vacinas são multivalentes

e contêm antígenos de outros agentes virais e bacterianos. O desenvolvimento de lesões oculares em cães vacinados com cepas atenuadas de CAdV-1 levou à troca desse vírus pelo CAdV-2 nas formulações das vacinas multivalentes.

O protocolo de vacinação recomendado consta de duas ou mais aplicações com intervalos de três a quatro semanas. A primeira aplicação deve ser realizada entre a sexta e a décima semana de vida dos filhotes.

6.1.2 Adenovírus canino tipo 2

A traqueobronquite infecciosa canina, ou tosse dos canis, é um enfermidade multifatorial em que um dos agentes envolvidos é o CAdV-2. Além deste, já foram relatados os seguintes agentes associados com a enfermidade: *Bordetella bronchiseptica*, parainfluenzavírus canino (CPIV), reovírus canino tipos 1, 2 e 3, *Mycoplasmas* spp e *Ureaplasmas* spp. No entanto, os agentes mais frequentemente isolados de casos da doença são o CPIV e a *Bordetella bronchiseptica*. Alguns fatores, como produtos de limpeza à base de formol, poeiras, alterações bruscas de temperatura e aglomeração de cães também podem favorecer o desenvolvimento da doença. A infecção resulta em lesão do epitélio respiratório, inflamação aguda e perda da função dos cílios das vias aéreas.

A transmissão do CAdV-2 ocorre por aerossóis e é frequente em locais que abrigam cães (exposições, abrigos, lojas, hospitais veterinários e instalações de pesquisa). O agente também pode ser transmitido por contato direto ou indireto por fômites (gaiolas, comedouros, bebedouros, funcionários entre outros). O período de incubação varia entre cinco e sete dias, com extremos de três e dez dias.

Os sinais clínicos podem variar desde sinais respiratórios leves até doença respiratória severa. O principal sinal observado é uma tosse seca e intermitente, de aparecimento súbito, podendo ser confundida com obstruções esofágicas. Pode-se observar ainda tonsilite, laringite, faringite e aumento das secreções nasal e ocular. Casos graves podem ocorrer após infecções bacterianas secundárias, com o desenvolvimento de broncopneumonia, anorexia, tosse produtiva, febre e descarga óculo-nasal mucopurulenta.

As técnicas de diagnóstico da infecção pelo CAAdV-2 são as mesmas recomendadas para o CAAdV-1. Nesses casos, pode-se utilizar como material o lavado laringotraqueal ou amostras de pulmão.

O controle da enfermidade é baseado no uso de vacinas multivalentes, cuja primovacinação deve ser realizada entre a sexta e décima semanas de vida. Existem dois tipos de vacina contra a traqueobronquite infecciosa; uma de aplicação intranasal e outra injetável (IM ou SC). As duas contêm antígenos do CAAdV-2 e do CPIV, além de antígenos bacterianos (*Bordetella bronchiseptica*). A vacina intranasal é considerada a mais efetiva, pois induz imunidade local (IgA). As vacinas não são capazes de prevenir a infecção, e mesmo os cães vacinados podem apresentar sinais clínicos leves ou infecção subclínica, podendo transmitir os agentes para outros cães. Outras recomendações para o combate à enfermidade incluem o isolamento dos animais afetados e o controle dos fatores ambientais mencionados.

6.2 Adenovírus bovino

O adenovírus bovino (BAdV) pode ser classificado em dez tipos e esses vírus estão geralmente associados com conjuntivite, pneumonia, enterite e/ou poliartrite. No entanto, alguns tipos têm sido isolados de bovinos sem sinais clínicos. Estudos sorológicos demonstram que a infecção pelos BAdVs apresenta distribuição mundial.

O adenovírus bovino tipo 3 (BAdV-3) é considerado um importante patógeno respiratório de bovinos jovens. Os sinais clínicos da infecção aguda incluem hipertermia, dificuldade respiratória e descarga nasal e ocular. As lesões são encontradas com maior frequência nos pulmões, com áreas de consolidação, colapso e enfisema. Na microscopia, observa-se bronquiolite proliferativa, necrose e oclusão dos brônquios, além de colapso dos alvéolos. Corpúsculos de inclusão são encontrados nos tecidos pulmonares e das vias aéreas.

O diagnóstico da infecção pode ser realizado por isolamento do vírus ou por sorologia. Amostras de fezes e secreções oculares podem ser utilizadas para o isolamento viral. As técnicas

sorológicas utilizadas são a SN, a IDGA, HI e fixação do complemento (FC). Na Europa, uma vacina contendo o BAdV-1, o BAdV-3 e o BAdV-4 tem sido utilizada de forma limitada para o controle da enfermidade. O BAdV-3 tem sido extensivamente utilizado como vetor para vacinas recombinantes.

6.3 Adenovírus eqüino

As infecções pelo adenovírus eqüino tipo 1 (EAdV-1) são usualmente inaparentes ou acompanhadas por sinais respiratórios leves. A transmissão ocorre por contato direto, principalmente pelas vias oral e nasofaríngea. Estudos sorológicos indicam que a prevalência da infecção varia entre 60 e 75% entre diferentes raças, sendo de 90% em animais da raça árabe. Isso demonstra a ampla disseminação do agente nos rebanhos eqüinos.

Os cavalos da raça árabe que apresentam imunodeficiência primária severa – uma doença autossomal que cursa com ausência de linfócitos T e B funcionais – apresentam uma maior susceptibilidade ao EAdV-1, principalmente após o término da imunidade passiva. Animais com idade inferior a três meses apresentam infecção generalizada aguda e fatal. Nesses casos, a morbidade da doença varia entre 10 e 15%, e a letalidade pode chegar a 100%. As lesões podem ser encontradas em vários órgãos, como o pâncreas, glândulas salivares, epitélio intestinal, renal, bexiga e células do trato respiratório.

A patogenia e a patologia das infecções pelo EAdV-1 são pouco conhecidas, pois em animais imunocompetentes essas infecções são geralmente autolimitantes. Alterações macroscópicas e microscópicas podem ser observadas quase exclusivamente nos eqüinos da raça árabe que morrem como resultado da infecção. No sistema respiratório, observa-se bronquiolite, atelectasia pulmonar e pneumonia. Alterações microscópicas incluem hiperplasia, corpúsculos de inclusão e necrose de células epiteliais do trato respiratório e do epitélio de transição da pelve renal, ureter, bexiga urinária e uretra.

O diagnóstico da infecção pode ser realizado por isolamento viral em células de origem eqüi-

na, a partir de secreções nasais ou de fragmentos de tecidos do sistema respiratório. Técnicas de detecção do DNA viral (PCR, hibridização *in situ*, hibridização) e de antígenos virais (ELISA e IFA) também podem ser realizadas em amostras de tecido. Testes sorológicos pareados, como a SN e HI, também podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção. Não há descrições de programas de controle para esse agente, pois a maioria das infecções é inaparente e autolimitante.

6.4 Adenovírus de ruminantes silvestres (*Deer adenovirus* ou *black tail deer adenovirus*)

Alguns adenovírus também têm surgido como vírus emergentes. Em uma epidemia em 1993, um desses vírus se disseminou entre cervídeos (*mule deer*; *Odocoileus hemionus*) no estado da Califórnia, EUA. A infecção foi caracterizada por erosões no epitélio respiratório e intestinal, hemorragias e abscessos no intestino. Histologicamente, foi observada vasculite sistêmica e presença de corpúsculos de inclusão intranucleares. O diagnóstico laboratorial foi baseado na detecção de antígenos virais nos tecidos por IFA e pela detecção do vírus por microscopia eletrônica.

6.5 Adenovírus aviários

Vários adenovírus infectam aves, produzindo doenças como a síndrome da queda de postura, bronquite, imunossupressão, artrite e pancreatite. Dentre os adenovírus aviários existem representantes dos gêneros *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* e *Atadenovirus*, além de referências que classificam os *Aviadenovirus* em sorogrupos I, II e III.

6.5.1 *Aviadenovirus*

A infecção de aves pelos *aviadenovirus* cursa principalmente com manifestações respiratórias e digestivas. A etiopatogenia dessas doenças pode estar relacionada com infecções concomitantes com outros vírus, como o birnavírus (doença de Gumboro) ou o circovírus (vírus da anemia infecciosa).

Dentre as infecções respiratórias por adenovírus em aves, destaca-se a bronquite das codornas, produzida pelo adenovírus aviário A (*Fowl adenovirus* A; FAdV-A). A infecção de codornas jovens pelo FAdV-A pode resultar em mortalidade de 100%. No entanto, as taxas de mortalidade em aves com mais de quatro semanas de idade são reduzidas para menos de 25%. A infecção também pode produzir enterite e diarreia. Os sinais clínicos são mais frequentes nas codornas de cabelo branco (*Colinus virginianus*) e nas codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). Os efeitos são devastadores e podem inviabilizar a criação após a ocorrência de surtos. As aves que se recuperam da infecção desenvolvem imunidade duradoura. O controle da enfermidade baseia-se em medidas preventivas, destinadas a evitar a introdução do vírus na criação, como a quarentena de aves a serem introduzidas e desinfecção das instalações.

O diagnóstico pode ser realizado pelo isolamento do vírus do trato respiratório e do intestino de aves durante a infecção aguda.

Cinco adenovírus aviários têm sido associados com surtos de doença em frangos (FAdV tipos A, B, C, D e E). Essas epidemias se caracterizam por mortalidade elevada, podendo atingir até 30%. O curso da doença é de três a quatro dias e caracteriza-se por hepatomegalia e hemorragias. A hepatite pode ser demonstrada pela presença de corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos e material granular e fibrilar. A infecção pelos adenovírus aviários A ou B (*Fowl adenovirus* B; FAdV-B) pode ocorrer concomitantemente com a infecção pelo birnavírus ou pelo circovírus.

6.5.2 *Siadenovirus*

Apenas uma espécie de *siadenovirus* tem sido associada com enfermidade em aves, o adenovírus de perus A (*Turkey adenovirus* A; TAdV-A). Essa espécie de vírus possui três membros que infectam aves: o adenovírus de perus tipo 3 (*Turkey adenovirus* 3; TAdV-3), o adenovírus de faisões (*Pheasant adenovirus* 1; PAdV-1) e o vírus da enterite hemorrágica dos perus (*Turkey hemorrhagic enteritis virus*; THEV). Esses vírus estão

associados com três síndromes distintas: a esplenomegalia dos frangos de corte (TAdV-3), a doença do baço marmóreo dos faisões (PAdV-1) e a enterite hemorrágica dos perus (THEV).

Em faisões, a doença do baço marmóreo acomete aves com 12 a 32 semanas. Em frangos, a esplenomegalia geralmente se desenvolve em aves com mais idade. A enterite hemorrágica acontece em perus com idade superior a quatro semanas, com maior frequência entre as sete e nove semanas. Aparentemente, as aves mais jovens são mais resistentes.

Os sinais comuns às infecções por esses três agentes incluem depressão, diarreia hemorrágica e morte, geralmente uma semana após a infecção. Existem evidências de imunossupressão. O curso da doença em perus pode ser de 10 dias, apresentando-se de forma aguda ou superaguda. A mortalidade pode atingir 60% em perus; 20% em faisões e até 10% em frangos, dependendo do isolado do vírus. A principal forma de transmissão desses vírus é a horizontal, pela via fecal-oral, não existindo evidências de transmissão vertical.

As lesões no baço dos faisões são consideradas patognômicas, com hiperplasia retículo-endotelial e a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares nas células. Esplenomegalia, edema pulmonar e congestão com conteúdo hemorrágico nos intestinos podem ser observados na necropsia. Os corpúsculos de inclusão podem ser detectados também em linfócitos B e em células mononucleares.

O diagnóstico da infecção pode ser realizado pelo isolamento dos TAdV-A após a inoculação de material suspeito em células linfoblastóides ou por inoculação de perus com cinco a dez semanas de idade (para o THEV). Antígenos virais podem ser detectados por IFA no baço, no intestino e em órgãos linfóides. As técnicas de ELISA e IDGA podem ser utilizadas para detecção de antígenos em macerados de tecidos. A técnica de PCR tem sido descrita para a detecção do genoma viral em amostras de tecidos. A sorologia pareada pode também ser empregada, podendo ser utilizadas as técnicas de HI ou SN.

O controle é baseado principalmente na vacinação. Existe uma vacina atenuada disponível para faisões e perus. Essa vacina é fornecida na

água de bebida e deve ser administrada em aves com quatro a cinco semanas de idade, pela possibilidade de interferência de anticorpos adquiridos passivamente.

6.5.3 Atadenovirus

A infecção mais importante por adenovírus em frangos é a causada pelo adenovírus de patos A (*Duck adenovirus A*, DAdV-A). Além de frangos, esse vírus produz infecções em patos e gansos. A doença causada pelo DAdV-A é conhecida como síndrome da queda da postura (EDS, *egg drop syndrome*) ou EDS-76, em referência ao ano do primeiro diagnóstico realizado na Irlanda do Norte e Holanda, em 1976. Nesse mesmo ano, a doença foi descrita em aves reprodutoras do Rio Grande do Sul. As aves afetadas apresentaram queda de postura após a aplicação de vacinas contra a doença de Marek, importadas, e que haviam sido produzidas em embriões de pato.

Atualmente, a infecção encontra-se disseminada mundialmente. A disseminação ocorreu principalmente por transmissão vertical a partir de reprodutoras infectadas e/ou pela utilização de vacinas contaminadas. Na América do Norte, onde não houve a utilização de vacinas contaminadas, o impacto econômico foi menor. Não obstante, neste continente, o vírus já foi isolado de patos e gansos selvagens. Os vírus isolados de pintos e patos da Europa apresentam maior virulência se comparados com aqueles isolados de patos nos EUA.

Tem sido observada uma associação da doença com matrizes de ovos marrons em comparação com matrizes poedeiras de ovos brancos, e o primeiro sinal observado é a despigmentação dos ovos. A maioria dos países desenvolvidos conseguiu a erradicação do vírus de criações comerciais de aves reprodutoras.

A principal forma de transmissão do DAdV-A é a vertical, e a fêmea geralmente permanece soronegativa até o início da postura. A transmissão horizontal, pela via orofecal, também pode ocorrer, porém a disseminação do vírus é lenta. As aves positivas não transmitem o vírus após a 45ª semana de idade. A transmissão pode ocorrer entre galinhas, entre patos e entre gansos por

contato direto ou por contato indireto, por meio de fômites contaminados.

A replicação viral ocorre nos tecidos linfóides, em um período de três a quatro dias após a infecção. Aos sete dias, o vírus pode ser detectado na glândula da casca e no oviduto. O vírus não replica na mucosa intestinal, portanto, as partículas virais encontradas nas fezes provavelmente são provenientes do oviduto.

As lesões ocorrem principalmente nas aves infectadas pela forma vertical, uma vez que a infecção natural de animais adultos é limitada à mucosa oral. Nesses casos, porém, pode também ocorrer viremia. As lesões macroscópicas incluem a atrofia do oviduto, perda da função ovariana e edema uterino. Raramente observa-se esplenomegalia, flacidez do ovário e presença de óvulos na cavidade abdominal. Microscopicamente, observam-se corpúsculos de inclusão e necrose em células epiteliais da glândula da casca e do oviduto e infiltração de células inflamatórias. Esses corpúsculos são considerados achados patognômicos da EDS.

As patologias produzidas pelo vírus determinam a queda de postura de 10 a 30%, por seis a oito semanas. Também ocorre despigmentação da casca dos ovos, além de postura de ovos com casca frágil ou sem casca. Na fase de crescimento das aves, pode-se observar diarreia entre a 15ª e 25ª semanas de idade. Formas endêmicas da infecção, produzidas por cepas pouco virulentas, podem se resumir em queda discreta da postura, que pode passar despercebida.

O diagnóstico pode ser realizado pelo isolamento do vírus em embriões e fibroblastos de patos ou de gansos. Células de fígado de pintos são mais sensíveis do que as células de origem renal para o isolamento. Fibroblastos de pinto ou ovos embrionados não são indicados para a amplificação do vírus. A presença do vírus pode ser detectada por hemaglutinação, utilizando-se eritrócitos de aves.

Dentre os testes sorológicos que podem ser utilizados estão a HI, ELISA, SN, IDGA e imunofluorescência indireta (IFI). As técnicas de HI e SN possuem especificidade adequada, pois não detectam anticorpos contra outros adenovírus. Alguns animais infectados pela via vertical não

desenvolvem anticorpos até o início da fase reprodutiva. Portanto, aves positivas para o vírus podem ser soronegativas; e a detecção de anticorpos deve ser realizada principalmente após o pico da postura.

A eliminação de matrizes positivas é o método definitivo para a erradicação da infecção das criações. Pode-se também recorrer a métodos mais conservadores, como a incubação somente de ovos de reprodutoras com idade superior a 45 semanas. A vacinação de lotes é realizada com vacina inativada (adjuvante oleoso) e deve ser realizada antes da 18ª semana de idade. Essa doença tem sido eliminada em alguns países mediante a prevenção do contato de frangos com aves aquáticas, pela desinfecção regular dos equipamentos e pela cloração da água de bebida.

7 Bibliografia consultada

BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. 800p.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. 1592p.

CAUDELL, D. et al. Diagnosis of infectious canine hepatitis virus (CAV-1) infection in puppies with encephalopathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.58-61, 2005.

CENTER, S.A. Acute hepatic injury: hepatic necrosis and fulminant hepatic failure. In: GUILFORD, W.G. et al. **Small animal gastroenterology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1996. p.654-704.

CENTER, S.A.; HORNBuckle, W.E; HOSKINS, J.D. O fígado e o pâncreas. In: HOSKINS, J.D. (ed). **Pediatria veterinária**. São Paulo: Manole, 1993. p.223-270.

CHOUINARD, L. et al. Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis or cirrhosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p.320-325, 1998.

CORNELIUS, L.M. Interpreting increased liver enzyme activity in dogs. **Veterinary Medicine**, v.92, p.876-881, 1997.

FLINT, S.J. et al. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. 804p.

GOCKE, D.J.; MORRIS, T.Q.; BRADLEY, S.E. Chronic hepatitis in a dog: the role of immune factors. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, n.156, p.1700-1705, 1970.

- GREENE, C.E. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In: _____. **Infectious disease of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1998. p.22-28.
- HUGHES, D.; KING, L.G. The diagnosis and management of acute liver failure in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.25, p.437-460, 1995.
- JOHNSON, B.C.; MILLER, W.W. Recognising ocular signs of systemic diseases in dogs. **Veterinary Medicine**, v.85, p.1076-1090, 1990.
- LAPPIN, M.R. Viral diseases. In: LEIB, M.S.; MONROE, W.E. (eds). **Practical small animal internal medicine**. Philadelphia, PA: Saunders, 1997. p.873-902.
- MARTIN, C.L. Ocular signs of systemic diseases. **Modern Veterinary Practice**, v.63, p.689-694, 1982.
- McCANDLISH, I.A.P. Infecções específicas caninas. In: DUNN, J.K. (ed). **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. p.915-952.
- McFERRAN, J.B. Adenoviruses. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. (eds). **Veterinary diagnostic virology: a practitioner's guide**. St Louis: Mosby, 1992, p.18-19.
- MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. p.327-335.
- RAKICH, P.M. et al. Immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. **Veterinary Pathology**, v.23, p.478-484, 1986.
- SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J. et al. Glomerulonephritis Associated with Simultaneous Canine Adenovirus-1 and *Dirofilaria immitis* Infection in a Dog. **Journal of Veterinary Medicine**, v.49, p.235-239, 2001.
- SHENK, T. Adenoviridae. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLE, P.M. (eds). **Fundamental virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p.979-1016.
- SHENK, T.E. Adenoviridae: the viruses and their replication.. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.67, p.2265-2300.
- SIMPSON, K.W.; CENTER, S.A.; BIRNBAUM, N. Fluid and electrolyte disturbances in gastrointestinal, pancreatic, and hepatic disease. In: DIBARTOLA, S.P. **Fluid therapy in small animal practice**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2000. p.330-374.
- TABOADA, J.; DIMSKI, D.S. Hepatic encephalopathy: clinical signs, pathogenesis, and treatment. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v.25, p.337-355, 1995.
- WATSON P.J. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. **Veterinary Journal**, v.167, p.228-241, 2004.
- ZEE, Y.C. Adenoviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology**. Massachusetts: Blackwell Science, 1999. p.346-349.

1 Introdução	435
2 Classificação e nomenclatura	435
2.1 Subfamília <i>Alphaherpesvirinae</i>	436
2.2 Subfamília <i>Betaherpesvirinae</i>	436
2.3 Subfamília <i>Gammapherpesvirinae</i>	436
3 Propriedades gerais dos herpesvírus	438
4 Estrutura dos vírions	438
4.1 O núcleo	439
4.2 O capsídeo	439
4.3 O tegumento	439
4.4 O envelope	439
4.5 O genoma	440
5 Replicação	440
5.1 O ciclo replicativo	441
5.2 Infecção latente	445
6 Herpesvírus de interesse veterinário	447
6.1 Herpesvírus de bovinos	447
6.1.1 Herpesvírus bovino tipo 1	447
6.1.2 Herpesvírus bovino tipo 2	454
6.1.3 Herpesvírus bovino tipo 4	457
6.1.4 Herpesvírus bovino tipo 5	459
6.1.5 Herpesvírus associados com a febre catarral maligna	463
6.2 Herpesvírus de caprinos	465
6.2.1 Herpesvírus caprino tipo 1	465

¹ Colaboraram com seções específicas: Eduardo Furtado Flores (BoHV-2, BoHV-4); Renata Dezengrini (FeHV-1); Letícia F. da Silva (CpHV-1).

6.3 Herpesvírus de suínos	467
6.3.1 Herpesvírus suíno tipo 1 (vírus da doença de Aujeszky)	467
6.4 Herpesvírus de eqüinos	472
6.4.1 Herpesvírus eqüino tipo 1	472
6.4.2 Herpesvírus eqüino tipo 3	475
6.4.3 Herpesvírus eqüino tipo 4	476
6.5 Herpesvírus de cães	478
6.5.1 Herpesvírus canino tipo 1	478
6.6 Herpesvírus de felinos	479
6.6.1 Herpesvírus felino tipo 1	479
6.7 Herpesvírus de aves	481
6.7.1 Vírus da doença de Marek.....	481
6.7.2 Vírus da laringotraqueíte infecciosa	484
7 Bibliografia consultada	485

1 Introdução

A palavra *herpes* origina-se da palavra grega *herpein*, que significa rastejar ou rastejamento. Esta palavra está relacionada com as primeiras observações das lesões causadas por vírus desta família, lesões que pareciam “rastejar” na superfície da pele das pessoas afetadas. Além desta, outra propriedade muito importante apresentada por, virtualmente, todos os herpesvírus é a capacidade de causarem infecções inaparentes ou latentes. Assim, uma vez infectado por um herpesvírus, o hospedeiro permanece portador do vírus na forma latente. A latência é caracterizada pela ausência de replicação viral e de sinais clínicos, e dura toda a vida do hospedeiro. Durante esse período, o animal pode não apresentar sinais clínicos e raramente excreta o vírus. No entanto, a infecção latente pode ser ocasionalmente reativada por situações de estresse, ocasiões em que o vírus é re-excretado pelo hospedeiro e pode se disseminar para indivíduos susceptíveis.

Os herpesvírus são muito antigos e, aparentemente, vêm co-evoluindo com os seus hospedeiros há quase um bilhão de anos. As várias semelhanças observadas na estrutura de diferentes herpesvírus sugerem que eles tenham surgido de um ancestral comum, que parece ter dado origem a duas linhagens: uma representada pelo herpesvírus alfa, beta e gama, que infectam aves e mamíferos; e a outra representada pelos herpesvírus de animais de sangue frio. Estudos genéticos sugerem que os herpesvírus evoluíram paralelamente aos seus hospedeiros, o que explica o alto nível de adaptação observado entre esses agentes e os seus hospedeiros naturais.

A capacidade dos herpesvírus de causar infecções latentes duradouras nos seus hospedeiros naturais, sem causar doença grave ou mortalidade, possibilita a transmissão viral entre hospedeiros de forma altamente eficaz. Esse não é o caso das infecções de hospedeiros acidentais, aos quais os herpesvírus não se encontram tão bem adaptados. Nesses casos, infecções fatais podem ocorrer, como nas infecções de bovinos e cães com o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1).

Os herpesvírus estão amplamente distribuídos na natureza. A maioria das espécies animais

serve de hospedeiro natural de pelo menos um membro da família. Apesar disso, os herpesvírus identificados até o momento ainda são em pequeno número, compreendendo aproximadamente 130 espécies. Existem vários herpesvírus de importância veterinária, visto que cada espécie doméstica alberga pelo menos um desses agentes. Como exemplos, podem-se citar: os herpesvírus bovino tipos 1, 2, 4 e 5 (BoHV-1, BoHV-2, BoHV-4 e BoHV-5); os herpesvírus eqüino tipos 1, 3 e 4 (EHV-1, EHV-3, EHV-4); o SuHV-1 (também denominado de vírus da doença de Aujeszky ou da pseudorraiva, PRV); o herpesvírus caprino tipo 1 (CpHV-1); o herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1); o herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1); os herpesvírus de galídeos tipo 1 e tipo 2 (GaHV-1 e 2). Dentre os membros dessa família que infectam humanos, pode-se citar o herpesvírus humano 1 (HHV-1 ou vírus do herpes simplex, HSV-1); o herpesvírus humano 2 (HHV-2 ou HSV-2); o herpesvírus humano 3 (HHV-3, agente da varicela-zoster, VZV); o citomegalovírus (HCMV); o vírus Epstein-Barr (EBV) e os herpesvírus humanos 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, e HHV-8).

A maioria dos herpesvírus de animais domésticos produz geralmente infecções inaparentes ou leves nos seus hospedeiros. Alguns herpesvírus são estreitamente associados com células, e um pequeno número deles têm capacidade oncogênica, cuja infecção resulta na produção de tumores, como o GaHV-2 (agente da doença de Marek).

Em geral os herpesvírus estão disseminados nas populações animais e são detectados com frequência em laboratórios de diagnóstico, pois se multiplicam com facilidade em cultivos celulares (ex: SuHV-1, BoHV-1 e BoHV-5) ou em membrana corioalantóide (ex: GaHV-2).

Este capítulo irá abordar somente as infecções causadas por herpesvírus que afetam animais de importância em medicina veterinária.

2 Classificação e nomenclatura

Os membros da família *Herpesviridae* são classificados em três subfamílias, de acordo com suas propriedades biológicas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*. Além des-

ses, existem vários herpesvírus que ainda não foram definitivamente classificados, entre eles destaca-se o SuHV-2, o citomegalovírus de suínos. Os membros das respectivas subfamílias são agrupados em gêneros, de acordo com a homologia das seqüências de DNA, similaridades na estrutura e organização genômica e relação antigênica. A Tabela 17.1 apresenta os principais herpesvírus que afetam animais e que serão abordados neste capítulo.

A nomenclatura dos herpesvírus, assim como de outras famílias virais, tem sido alvo de alterações nas últimas décadas, fruto de tentativas de estabelecer uma nomenclatura universal para esses agentes. Assim, o vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1), que é o protótipo da família, foi recentemente denominado HHV-1 (herpesvírus humano tipo 1). Outros vírus foram também renomeados, buscando adaptar-se às instruções do ICTV (*International Committee for Taxonomy of Viruses*). Para evitar confusão e contradição com os demais capítulos, nos quais tais vírus são mencionados, este capítulo utilizará a nomenclatura clássica consagrada. Os casos em que a nova nomenclatura for empregada serão assinalados.

2.1 Subfamília *Alphaherpesvirinae*

A classificação dos herpesvírus nessa subfamília é feita com base em suas características biológicas: os alfa herpesvírus possuem uma gama variável de hospedeiros, apresentam um ciclo replicativo relativamente curto (< 24 horas), destroem rapidamente as células de cultivo e estabelecem infecções latentes primariamente em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos. Essa subfamília abriga os gêneros *Simplexvirus* (cujo protótipo é o HHV-1 ou HSV-1, agente do herpes labial), *Varicellovirus* (protótipo: HHV-3 ou VZV, agente da varicela-zoster), *Mardivirus* (protótipo: GaHV-2, agente da doença de Marek) e *Iltovirus* (protótipo: GaHV-1, agente da laringotraqueíte infecciosa [ILTV]). A maioria dos herpesvírus de importância veterinária pertence ao gênero *Varicellovirus* (Tabela 17.1).

2.2 Subfamília *Betaherpesvirinae*

Os vírus que pertencem a essa subfamília possuem uma gama restrita de hospedeiros e apresentam um ciclo replicativo longo, ou seja, a infecção progride lentamente em cultivos celulares. As células infectadas freqüentemente apresentam aumento de volume (citomegalia) e a infecção natural resulta na produção de animais portadores. O vírus pode ser mantido de forma latente em tecidos glandulares, células linfocitárias, rins e outros tecidos. Esta subfamília é dividida nos gêneros *Cytomegalovirus* (cujo protótipo é o herpesvírus humano 5 [HHV-5], também denominado citomegalovírus humano [HCMV]), *Muromegalovirus* (protótipo: citomegalovírus murino) e *Roseolovirus* (cujo protótipo é o herpesvírus humano 7, HHV-7). Esta família abriga importantes patógenos humanos, além de abrigar vírus que afetam algumas espécies animais, como primatas e roedores.

2.3 Subfamília *Gammapherpesvirinae*

Os vírus classificados nessa subfamília também possuem uma gama restrita de hospedeiros. Além disso, estabelecem infecções latentes principalmente em células linfoblastóides. Alguns membros podem produzir infecções líticas em células epitelióides e fibroblásticas. Esses vírus possuem potencial oncogênico e podem ser especificamente adaptados a linfócitos B ou T. Infecções latentes são freqüentemente observadas em tecidos linfóides. Essa subfamília contém três gêneros: *Lymphocryptovirus* (cujo protótipo é o herpesvírus humano tipo 4 [HHV-4] ou vírus Epstein-Barr [EBV]), *Rhadinovirus* (cujo protótipo é o herpesvírus saimiri 2 [SaHV-2]) e *Ictalurovirus* (cujo protótipo é o herpesvírus do *catfish* [IcHV-1]). Vários vírus classificados nessa subfamília afetam espécies animais e alguns possuem importância em medicina veterinária, como o agente da febre catarral maligna associada a ovinos (MCFV ou OvHV-2).

Tabela 17.1. Herpesvírus de importância em medicina veterinária.

Subfamília	Gênero	Espécie	Enfermidade
Alphaherpesvirinae	<i>Varicellovirus</i>	Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	Rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa/balanopostite pustular infecciosa, abortos.
	<i>Simplexvirus</i>	Herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2)	Mamilitite herpética bovina
		Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-2)	Encefalite herpética bovina
		Herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1)	Infecção herpética em cães
		Herpesvírus caprino tipo 1 (CpHV-1)	Infecção herpética em caprinos
		Herpesvírus eqüino tipo 1 (EHV-1)	Aborto herpético eqüino
		Herpesvírus eqüino tipo 3 (EHV-3)	Exantema coital eqüino
		Herpesvírus eqüino tipo 4 (EHV-4)	Rinopneumonite viral eqüina
		Herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1)	Rinotraqueíte viral dos felinos
		Herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1)	Doença de Aujeszky ou pseudorraiva
	<i>Mardivirus</i>	Herpesvírus galádeo tipo 2 (GaHV-2)	Doença de Marek
		Herpesvírus galádeo tipo 3 (GaHV-3)	Doença de Marek
	<i>Iltovirus</i>	Herpesvírus galádeo tipo 1 (GaHV-1)	Laringotraqueíte viral infecciosa
Gammapherpesvirinae		Herpesvírus alcelaphine tipo 1 (AIHV-1)	Febre catarral maligna
		Herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4)	Associação com doença? Sinais respiratórios, abortos
		Herpesvírus ovino tipo 2 (OvHV-2)	Febre catarral maligna associada a ovinos
Vírus não-classificados		Herpesvírus ovino tipo 1 (OvHV-1)	Adenomatose pulmonar associada a herpesvírus
		Herpesvírus suíno tipo 2 (SuHV-2)	Citomegalovírus de suínos

3 Propriedades gerais dos herpesvírus

A inclusão de um vírus na família *Herpesviridae* é realizada com base na estrutura da partícula viral, no tipo e estrutura do genoma. Os vírions dos herpesvírus consistem de um núcleo (ou *core*) contendo uma molécula de DNA de fita dupla linear; um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro envolvendo o núcleo; uma camada protéica amorfa, chamada tegumento, que recobre o capsídeo; e um envelope lipoprotéico contendo espículas de glicoproteínas na sua superfície (Figura 17.1). O diâmetro dos vírions varia entre 120 e 300 nm. As partículas não possuem uma forma bem definida, podendo ser aproximadamente esféricas ou apresentar contorno irregular. Dentre as razões para a variação do diâmetro e da forma dos vírions estão a presença de quantidade variável de tegumento e a sua distribuição irregular nas partículas.

Os herpesvírus conhecidos apresentam algumas características biológicas em comum, a saber:

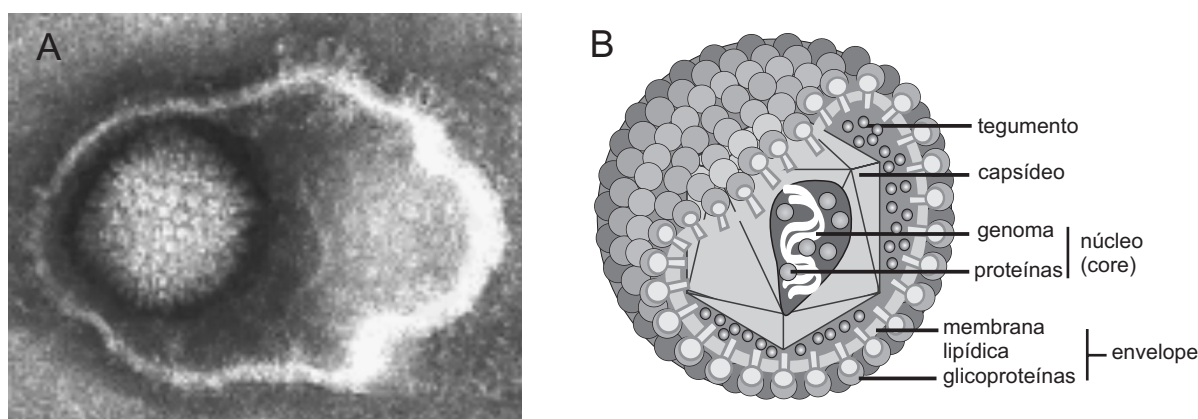
- codificam um grande número de enzimas relacionadas com o metabolismo de nucleotídeos, síntese do ácido nucléico e processamento de proteínas;

- a síntese do DNA viral e a montagem do capsídeo ocorrem no núcleo da célula hospedeira. A aquisição do envelope viral ocorre durante o trânsito dos nucleocapsídeos através da membrana nuclear ou através de organelas citoplasmáticas envelopadas (p. ex.: complexo de Golgi);
- são capazes de permanecer latentes nos seus hospedeiros naturais. Nas células infectadas de forma latente, os genomas virais se mantêm na forma circular episomal, ocorrendo pouca ou nenhuma expressão gênica. Esses genomas retêm a capacidade de replicar, o que ocorre por ocasião da reativação da infecção latente.

Os herpesvírus são vírus facilmente inativados por álcoois e detergentes, em razão da presença do envelope lipoprotéico. Os vírions perdem a infectividade após o contato com isopropanol ou etanol a 70-80% por cinco minutos; formaldeído a 0,2-08% e glutaraldeído a 2%. Além disso, os vírions são inativados pelo contato por dez minutos com substâncias de pH abaixo de 3 e acima de 11.

4 Estrutura dos vírions

Os vírions dos herpesvírus variam de 120 a 300 nm em diâmetro. Parte dessa variação se deve à variabilidade na espessura do tegumento.



Fonte: A) Dra Linda Stannard. Web.uct.ac.za. B) Adaptada de Dr. Marko Reschke's Group, Marburg.

Figura 17.1. Vírions de membros da família *Herpesviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica do vírus do herpes simplex humano (HSV-1), o protótipo da família. B) Ilustração simplificada de uma partícula vírica com os seus componentes.

Outra fonte de variação no diâmetro dos vírions é o estado do envelope. Envelopes virais intactos são impermeáveis e, em geral, conferem uma forma praticamente esférica às partículas. Envelopes danificados são permeáveis a corantes. Vírions permeáveis apresentam uma aparência de “ovo frito”, com morfologia indefinida e diâmetro maior do que vírions intactos. A Figura 17.1 ilustra a estrutura de uma partícula vírica dos herpesvírus com os seus componentes.

4.1 O núcleo

O núcleo (ou *core*) de um vírion maduro contém o genoma viral conjugado com algumas proteínas codificadas pelo vírus. Em alguns herpesvírus, o DNA parece estar suspenso por uma massa proteinácea, que consiste de fibrilas que ficam também embebidas na parte interna do capsídeo viral. O genoma parece estar compactado em uma forma toróide ou de fuso e possui as extremidades livres, o que caracteriza os genomas lineares.

4.2 O capsídeo

Os capsídeos dos herpesvírus são icosaédricos e possuem um diâmetro aproximado de 100 nm. Esta estrutura é composta por 162 capsômeros, sendo 12 capsômeros pentaméricos localizados nos 12 vértices e 150 capsômeros hexaméricos constituindo as faces triangulares do icosaedro. Os capsômeros são arranjados formando uma simetria icosaédrica do tipo $T = 16$. Em preparações de vírions, três tipos de capsídeos podem ser observados sob microscopia eletrônica (ME): os capsídeos do tipo “A” são desprovidos da estrutura toróide (núcleo) interna; os capsídeos do tipo “B” contêm as proteínas que se conjugam ao genoma, mas são desprovidos de DNA e, finalmente, os capsídeos que contêm o DNA e as proteínas associadas são denominados “C”. Pelo menos quatro tipos de proteínas virais estão presentes na estrutura dos capsídeos.

4.3 O tegumento

O tegumento é a camada protéica que preenche o espaço entre o capsídeo e o envelope.

Estudos iniciais demonstraram que o tegumento apresentava aparência amorfa, mas recentemente observou-se, por imunomicroscopia, que esse componente apresenta certa organização estrutural, sobretudo nas proximidades dos vértices do capsídeo. O tegumento pode estar distribuído assimetricamente, e sua espessura pode variar de acordo com a localização do vírion dentro da célula infectada. Com isso, a morfologia e as dimensões das partículas víricas podem variar. Pelo menos oito tipos de proteínas codificadas pelo genoma viral estão presentes no tegumento. Destas, duas apresentam funções importantes na replicação viral, a VP16 (α TIF) e a VHS, envolvidas na ativação da transcrição dos genes alfa e na supressão da síntese protéica celular, respectivamente.

4.4 O envelope

Estudos de microscopia eletrônica têm demonstrado que o envelope dos herpesvírus possui uma aparência tipicamente trilaminar. O envelope viral origina-se de secções de membranas celulares alteradas e contém numerosas protruções de glicoproteínas. Essas protruções são mais numerosas e mais curtas do que as presentes na superfície de outros vírus envelopados. Além de conter várias glicoproteínas, o envelope também contém lipídeos. O número e a quantidade relativa de glicoproteínas do envelope viral variam de acordo com o vírus. Assim, o HSV-1 codifica pelo menos onze glicoproteínas, enquanto o número de moléculas de glicoproteínas individuais pode chegar a 1.000 por vírion. As glicoproteínas do HSV-1 já identificadas são: a gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK e gM. Essas glicoproteínas desempenham importantes funções, incluindo a ligação a receptores celulares, fusão, penetração e transporte das partículas virais entre células. No entanto, algumas delas não são essenciais para a replicação do vírus *in vitro* e podem ser deletadas experimentalmente sem afetar a capacidade do vírus replicar em cultivo celular. As glicoproteínas do envelope também medeiam as interações dos vírions com o sistema imunológico e se constituem em importantes alvos de anticorpos, muitos deles com atividade neutralizante.

4.5 O genoma

Os genomas extraídos de vírions e caracterizados até o presente são constituídos por moléculas de DNA lineares de fita dupla. Nos vírions, essas moléculas são compactadas ou empacotadas na forma de um toróide ou fuso, com as extremidades livres, porém próximas. Os genomas lineares circularizam imediatamente após a sua liberação no interior das células hospedeiras.

O genoma possui entre 125 e 235 quilopares de bases (kbp), dependendo da espécie viral. O genoma do HSV-1 já foi seqüenciado inteiramente e possui 152.2 kpb. Os genomas dos herpesvírus variam com relação à extensão, composição (conteúdo de GC-AT) e presença de seqüências repetidas. A composição de bases do DNA dos herpesvírus varia de 31 a 75% de G-C em relação ao total de nucleotídeos. A composição de GC no genoma do HSV-1 é de 68%. Além disso, a distribuição do conteúdo de GC também pode ser desigual ao longo do genoma. A variação na extensão do genoma está associada principalmente com a presença de seqüências terminais e internas repetidas. Por outro lado, deleções parciais também já foram relatadas, o que também pode resultar em variações na extensão do genoma.

Os genomas dos herpesvírus são organizados de formas diferentes com relação à localização e número de seqüências repetidas terminais e internas. De acordo com a organização genômica, esses vírus são divididos em seis grupos designados pelas letras A a F (ver Figura 6.9; Capítulo 6). A Figura 17.2 apresenta genomas representativos de três desses grupos.

O genoma dos herpesvírus possui mais de 70 genes, sendo que a maioria das proteínas codificadas e as suas funções já foram identificadas ou deduzidas. Curiosamente, parte desses genes (35 genes no caso do HSV-1) codifica proteínas que não são essenciais para a replicação do vírus em cultivo celular. Os genes situados nas regiões únicas (UL e US) estão presentes em apenas uma cópia no genoma, enquanto os genes localizados nas seqüências repetidas estão presentes em mais cópias. O significado biológico dessas duplicações gênicas não é conhecido. Os genes estão distribuídos nas duas cadeias do DNA em orientações obviamente opostas. Assim, a expressão dos

genes envolve a transcrição das duas cadeias. Os promotores de alguns genes estão situados nas regiões codificantes de genes adjacentes, o que faz com que manipulações genéticas do genoma tenham que ser feitas com critérios cuidadosamente determinados. Os genes são transcritos pela maquinaria celular de transcrição (RNA polimerase II e fatores de transcrição), possivelmente assistida por fatores virais. A transcrição de cada gene origina um RNA mensageiro (mRNA), que possui *cap* na extremidade 5' e é poliadenilado na extremidade 3'. Poucos transcritos dos herpesvírus sofrem *splicing* antes de serem exportados para o citoplasma.

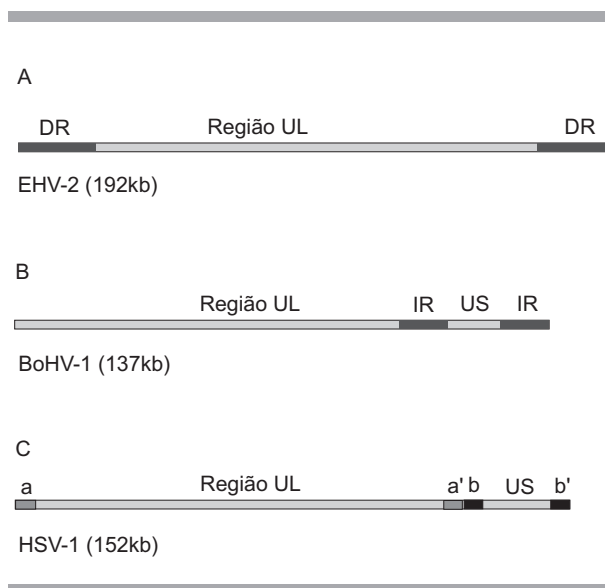


Figura 17.2. Organização do genoma de alguns herpesvírus. A) Genoma do tipo A: herpesvírus eqüino tipo 2 (EHV-2); B) Genoma do tipo D: herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1); C) Genoma do tipo E: herpesvírus humano tipo 1 (HSV-1). UL) região única longa; US) região única curta; IR) repetições invertidas; DR) repetições diretas.

5 Replicação

Considerando-se que os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* são os que apresentam maior importância em medicina veterinária, esta seção abordará a replicação dos vírus dessa subfamília.

Dois ciclos replicativos com características distintas podem ser reconhecidos na biologia dos alfa herpesvírus: a infecção aguda ou produtiva (ciclo lítico) e a infecção latente (Figura 17.3).

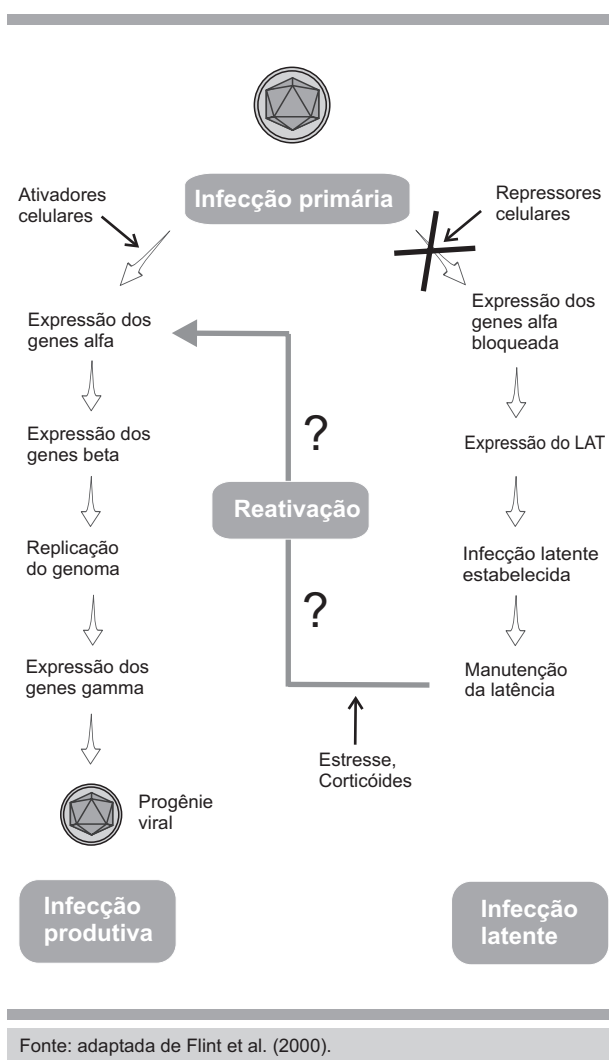


Figura 17.3. Etapa dos ciclos replicativos produtivo (lítico) e latente dos alfa herpesvírus. O ciclo replicativo lítico ocorre em células totalmente permissivas à replicação e resulta na produção de progênie infecciosa. A infecção latente ocorre em células semipermissivas, principalmente neurônios, e resulta na manutenção do genoma viral sem expressão gênica ou produção de progênie viral. Em determinadas situações, a infecção latente pode ser reativada e o vírus reassume a replicação produtiva.

A replicação produtiva lítica ocorre nos locais de penetração do vírus no hospedeiro (epitélios e tecidos subjacentes) e, provavelmente, também em neurônios, antes do estabelecimento e durante a reativação da infecção latente. Esse ciclo caracteriza-se pela expressão de todos os genes virais, replicação do genoma e produção de progênie viral infecciosa. A ocorrência do ciclo replicativo completo é incompatível com a sobrevivência das células hospedeiras.

A infecção latente ocorre em classes específicas de neurônios, principalmente em neurônios

dos gânglios sensoriais e autonômicos, mas parece ocorrer também em menor escala em outros tipos celulares. O estabelecimento da infecção latente é caracterizado pela interrupção do ciclo replicativo logo após a penetração do genoma no núcleo celular. Com isso, não há expressão gênica significativa, não ocorrendo produção de proteínas virais, replicação do genoma ou produção de progênie viral. Assim, o genoma viral permanece inativo no núcleo dos neurônios pelo resto da vida do animal. Em determinadas situações, geralmente associadas com estresse, o genoma é ativado e a expressão gênica é reiniciada, resultando na retomada da infecção produtiva e na produção de progênie viral. O estabelecimento e reativação da latência representam pontos-chave na biologia dos herpesvírus, pois permitem a permanência indefinida do vírus nos hospedeiros, acompanhada de episódios esporádicos de reativação e excreção viral.

5.1 O ciclo replicativo

O ciclo replicativo se inicia pela interação dos vírions com receptores da membrana plasmática das células-alvo. Os alfa herpesvírus utilizam moléculas de glicosaminoglicanos, como o sulfato de heparina, como receptores celulares. A interação dos vírions com as moléculas de sulfato de heparina é mediada pela glicoproteína C (gC). Entretanto, foi observado que células que não expressam esses receptores podem ser infectadas pelo HSV-1, porém, com menor eficiência. Isso indica que outras moléculas também podem desempenhar o papel de receptores para a adsorção desses vírions. Já foi demonstrado, por exemplo, que em vírus mutantes que não expressam a gC, a gD assume o papel de ligação aos receptores.

A adsorção é seguida da ligação de outra proteína viral – provavelmente a gD – com co-receptores da membrana plasmática. Um desses co-receptores é membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), chamado de HveA, presente principalmente em células linfóides. Outro co-receptor pertence à família dos receptores para poliovírus, do grupo das nectinas. A ligação com os co-receptores é seguida de fusão do envelope viral com a membrana plasmática, evento que ocorre na superfície celular,

sem a necessidade de internalização por endocitose e acidificação dos endossomos. A fusão entre o envelope e a membrana plasmática ocorre com a participação da gD, do heterodímero gH-gL e da gB. A transição entre o processo de adsorção e a penetração é muito rápida e ocorre em poucos minutos.

Após a fusão, algumas proteínas do tegumento se dissociam do nucleocapsídeo e permanecem no citoplasma, enquanto outras são transportadas até o núcleo. O nucleocapsídeo, ainda associado com algumas proteínas do tegumento, liga-se aos microtúbulos celulares e é, assim, transportado até as proximidades dos poros nucleares. Os nucleocapsídeos, então, associam-se aos complexos dos poros nucleares, ocorrendo a sua desintegração e a liberação do genoma no interior do núcleo. Os restos do capsídeo ficam retidos no lado citoplasmático da membrana nuclear.

Acredita-se que o genoma circularize imediatamente após a penetração no núcleo. Assim, os mecanismos de transcrição e replicação do DNA viral ocorreriam em genomas circularizados. A transcrição do genoma viral se inicia logo após a sua penetração no núcleo. O DNA viral é transcrito pela RNA polimerase II celular com o auxílio de fatores celulares e virais. A síntese de proteínas virais é regulada de forma precisa, pois a expressão de genes virais ocorre de forma coordenada e em ordem sequencial, em forma de uma reação em cascata. Vários produtos dos genes virais são enzimas e proteínas que se ligam ao DNA, envolvidas no processo de replicação do genoma.

De acordo com a cinética de expressão e com a função de seus produtos, os genes virais são divididos em três grupos principais: genes alfa (*immediate early* ou de transcrição imediata), beta (*early* ou iniciais) e gama (*late* ou tardios). Os genes alfa e beta são expressos abundantemente antes da replicação do genoma, enquanto os genes gama somente são expressos em quantidades significativas após a replicação do DNA viral.

Os primeiros genes a serem transcritos são os genes alfa, e a sua transcrição inicia imediatamente após a liberação do genoma no interior do

núcleo. A transcrição desses genes requer a presença de uma proteína que é componente do tegumento viral, chamada VP16 ou α TIF. Essa proteína se conjuga com um fator celular e estimula a transcrição de quatro genes, cujos produtos são as proteínas ICPO, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47. Essas proteínas têm, como principal função, estimular a transcrição dos genes beta.

Os produtos dos genes beta, por sua vez, são, principalmente, enzimas e proteínas acessórias envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e na replicação do genoma, incluindo a polimerase viral. Dentre esses produtos incluem-se as enzimas timidina quinase (TK) e ribonucleotídeo redutase (RR), que catalisam a síntese de nucleotídeos trifosfato. As proteínas beta também incluem proteínas de ligação ao DNA, helicase (UL9) e a própria DNA polimerase viral. Assim, a expressão dos genes beta é seguida de intensa síntese de nucleotídeos e replicação do genoma.

Após a replicação do genoma, o terceiro grupo de genes é expresso (genes tardios ou gama). Os produtos desses genes se constituem principalmente em proteínas estruturais do núcleo, capsídeo e envelope, que são, então, utilizadas na construção das partículas víricas. De acordo com a cinética de expressão e função, os genes tardios podem ser divididos em gama-1 e gama-2.

Várias proteínas virais são modificadas após a sua síntese, modificações que incluem clivagem proteolítica, fosforilação e glicosilação, entre outras. A maioria dessas modificações ocorre por ação de enzimas celulares, embora algumas enzimas virais possam também estar envolvidas nesses processos.

Simultaneamente à expressão das proteínas virais, ocorre a inibição da transcrição de genes, do processamento e transporte de mRNAs e síntese de proteínas da célula hospedeira. Esses eventos são induzidos por proteínas virais e têm como objetivo subverter a maquinaria celular para o processamento e transporte de mRNA virais e síntese de proteínas virais.

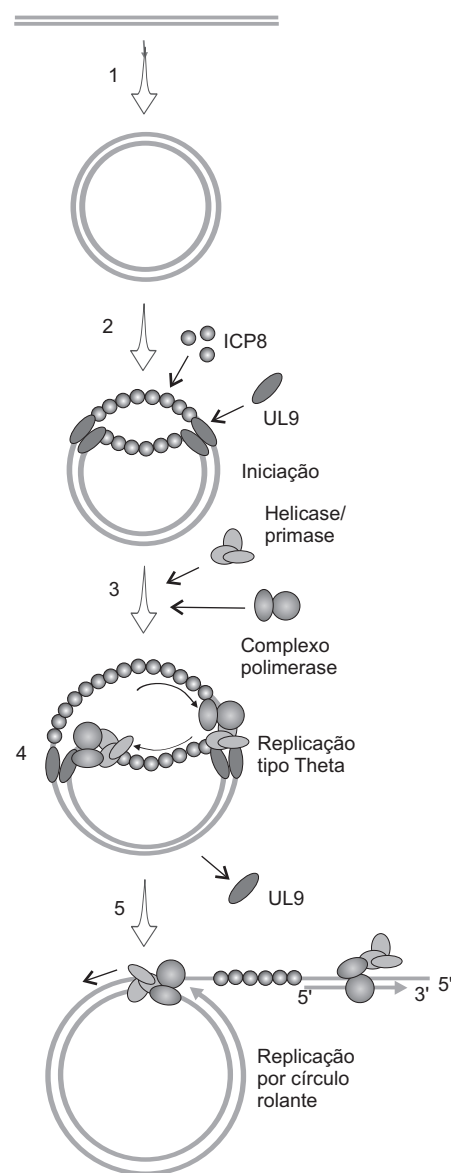
A maioria das proteínas dos genes beta é importada para o núcleo celular, onde se conjugam com o genoma, formando os sítios pré-replicativos. Esses sítios são os locais de iniciação da sín-

tese de DNA. Enquanto a síntese ocorre, as moléculas de DNA recém-produzidas se acumulam em compartimentos replicativos, localizados em determinadas áreas do núcleo, juntamente com os complexos de replicação. A síntese de DNA, a partir da molécula genômica parental, origina concatâmeros, que são macromoléculas lineares contendo várias unidades genômicas unidas entre si pelas extremidades, as quais se acumulam no núcleo da célula hospedeira.

A replicação do genoma viral depende de, pelo menos, sete proteínas codificadas pelo vírus, mas provavelmente envolve também a participação de fatores celulares, como a DNA polimerase-primase, DNA ligase e topoisomerase II. Três origens de replicação foram identificadas no genoma do HSV-1, sendo uma delas situada na região repetida invertida S (e, portanto, em duas cópias) e a outra localizada no componente L. Os primeiros passos da replicação do genoma envolvem a ligação e alteração das seqüências de origem da replicação pela proteína UL9. A proteína ICP8 liga-se, então, à UL9 ou a regiões de DNA de fita simples, e a UL9 inicia a sua atividade de helicase, separando as fitas do DNA viral. O complexo helicase-primase, que contém as proteínas virais UL5, UL8 e UL52, é, então, recrutado para o local onde se inicia a polimerização das cadeias-filhas pela polimerase viral. A DNA polimerase do HSV-1 é um heterodímero, composto pela proteína UL30 associada com a proteína UL42. A subunidade UL30 possui o sítio catalítico responsável pela polimerização das novas cadeias e também possui atividade de *proofreading* (correção dos erros). A proteína UL42 é necessária para a processividade da UL30.

Com base em informações disponíveis, foi proposto um modelo para a replicação do genoma do HSV-1 (Figura 17.4). Esse modelo propõe o início da replicação em uma molécula de DNA circularizada, seguida de replicação bidirecional que, posteriormente, é alterada para um mecanismo de círculo rolante. O resultado da replicação é a produção de moléculas longas, formadas por cópias genômicas múltiplas. Esses concatâmeros são posteriormente clivados, originando as moléculas genômicas individuais.

A montagem dos nucleocapsídeos ocorre em várias etapas. Após a síntese das proteínas tardias que participam da estrutura das partícu-



Fonte: adaptada de Roizman e Knipe (2001).

Figura 17.4. Modelo para a replicação do genoma dos alfavírus. O DNA genômico é circularizado logo após a penetração no núcleo (1). A UL9 se liga na origem de replicação, inicia a separação das cadeias e recruta a US8 (proteína de ligação em DNA de fita simples) para se ligar nas cadeias separadas (2). A US9 e US8 recrutam as cinco proteínas restantes, formando os complexos de iniciação (3), que iniciam a replicação bidirecional do tipo Theta (4). A replicação muda para o modo de círculo rolante por mecanismos desconhecidos (5). A replicação por círculo rolante produz múltiplos do genoma que são, posteriormente, clivados em unidades genômicas.

las, inicia-se o processo da montagem ainda no citoplasma. Essas proteínas pré-associadas entre si são transportadas para o núcleo, onde a montagem do capsídeo é finalizada pela inclusão do DNA genômico no seu interior. A introdução do genoma viral nos capsídeos pré-formados envolve um processo no qual grandes concatâmeros de DNA são clivados em monômeros e empacotados nos capsídeos pré-formados.

Após o encapsidamento do genoma, os nucleocapsídeos podem realizar o brotamento através da membrana nuclear interna. Esse processo é mediado pela interação entre proteínas do tegumento, adquiridas durante o brotamento e proteínas do capsídeo; e entre proteínas do tegumento e glicoproteínas virais presentes na membrana nuclear interna.

O mecanismo pelo qual os nucleocapsídeos saem do espaço entre as membranas nucleares interna e externa ainda não é claro, existindo dois modelos possíveis. O primeiro sugere que os nucleocapsídeos adquirem o envelope ao brotarem através da membrana nuclear interna. Este envelope seria perdido quando os vírions fusioanam com a membrana nuclear externa, liberando os nucleocapsídeos desprovidos de envelope no citoplasma. O outro modelo sugere que nucleocapsídeos no citoplasma são diretamente encaminhados ao complexo de Golgi, onde adquirem o envelope por brotamento. Vesículas derivadas do aparelho de Golgi, contendo vírions envelopados, seriam, então, transportadas até a superfície celular, onde os vírions seriam liberados por exocitose. Estudos recentes demonstraram que a aquisição do envelope por vírions do SuHV-1 segue o primeiro modelo. Foi demonstrado que nucleocapsídeos do SuHV-1 recebem o tegumento no citoplasma da célula infectada e são reenvelopados no complexo de Golgi. Após a adição do envelope, os vírions são liberados das células infectadas por fusão de vacúolos, contendo os vírions com a membrana plasmática, ou pela fusão entre células infectadas e não-infectadas, o que ocorre provavelmente através de junções celulares. O complexo formado entre as glicoproteínas I e E é necessário para esse tipo de dissemina-

ção viral, provavelmente porque o complexo gI-gE pode se ligar às junções celulares e mediar o movimento de vírions ao longo dessas junções. Quando os herpesvírus se multiplicam em células completamente permissivas, o ciclo replicativo é completado em aproximadamente 18-20 horas. O ciclo replicativo produtivo dos alfa herpesvírus está ilustrado na Figura 17.5.

As células infectadas com os alfa herpesvírus não sobrevivem à infecção, por causa de severas alterações estruturais e bioquímicas que ocorrem em consequência da replicação viral. Entre as alterações estruturais, podem-se citar as alterações na cromatina celular, duplicação e dobramento de membranas celulares, fragmentação e dispersão das membranas do complexo de Golgi, inserção de proteínas virais em membranas celulares, rearranjo da rede de microtúbulos e formação de corpúsculos de inclusão intranucleares. Entre as alterações bioquímicas celulares, incluem-se o bloqueio da síntese de proteínas celulares, degradação de mRNAs celulares, bloqueio da transcrição e redução da síntese de RNA celular, inibição do processamento de mRNA e degradação seletiva de proteínas celulares. Ainda, os herpesvírus podem interferir com o ciclo de divisão celular. Foi demonstrado que proteínas codificadas pelo HSV-1 e também pelo BoHV-1 se ligam a proteínas envolvidas no ciclo de divisão celular, como a ciclina D3. Neste caso específico, os produtos virais acabam por interferir com o processo de morte celular programada, ou apoptose, mantendo a célula viva durante a infecção.

Os alfa herpesvírus replicam em uma variedade de células *in vitro*, incluindo células primárias e linhagens celulares da espécie homóloga. A replicação é caracterizada por disseminação rápida nos cultivos e destruição dos tapetes celulares, em razão da lise celular induzida pelo vírus. Além de replicar em células da espécie homóloga, os diferentes herpesvírus podem ser adaptados para replicar em células de outras espécies animais. Os cultivos celulares utilizados para o isolamento e multiplicação dos diferentes herpesvírus serão abordados nas respectivas seções.

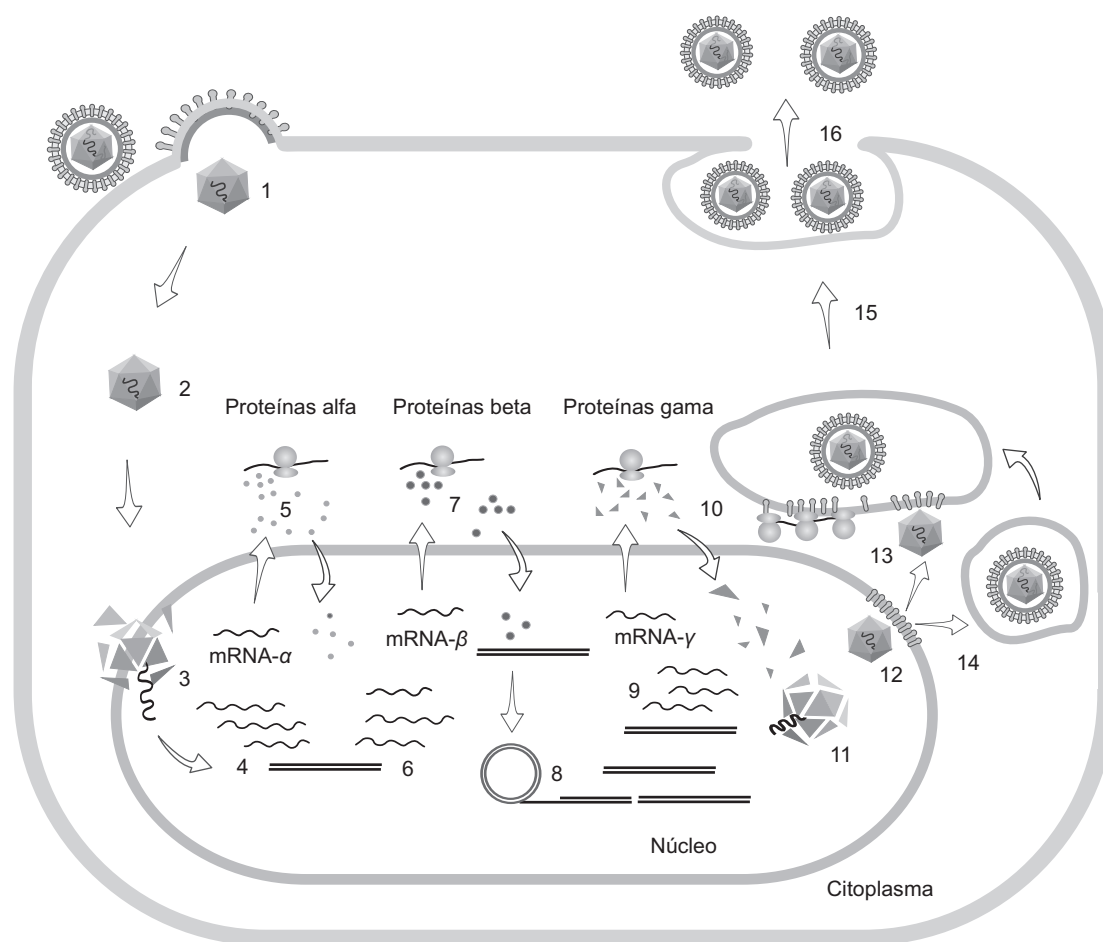


Figura 17.5. Ciclo replicativo dos alfa herpesvírus. Após a ligação aos receptores, a penetração ocorre por fusão do envelope com a membrana plasmática na superfície celular (1). Os nucleocapsídeos são transportados ao longo dos microtúbulos (2) até os poros nucleares, onde ocorre o desnudamento e a liberação do genoma no interior do núcleo (3). Segue-se a transcrição dos genes alfa (4) que são traduzidos nas proteínas alfa (5), cuja função principal é ativar a transcrição dos genes beta (6). As proteínas beta (7) estão envolvidas na síntese de nucleotídeos trifosfato e na replicação do genoma (8). Os genes gama somente são transcritos após a replicação do DNA (9) e codificam principalmente proteínas estruturais (10). Parte dessas proteínas penetra no núcleo e forma pré-capsídeos, nos quais o genoma é introduzido (11). Os nucleocapsídeos adquirem o envelope por brotamento através da membrana nuclear interna (12). Podem perder o envelope ao atravessar a membrana nuclear externa e serem reenvelopados no aparelho de Golgi (13), ou são enviados em vesículas até o Golgi (14). Os vírions envelopados são transportados em vesículas do trans-Golgi até a superfície celular (15), onde são liberados por exocitose (16).

5.2 Infecção latente

O estabelecimento de infecções latentes é um dos aspectos mais marcantes e provavelmente uma propriedade de todos os herpesvírus. Essa propriedade está relacionada com a capacidade desses vírus se adaptarem aos hospedeiros de forma a mantê-los vivos e, periodicamente, utilizá-los para se disseminar para novos hospedeiros. Na infecção latente, o genoma viral per-

manece inativo em células neuronais do hospedeiro, não resultando em produção de progênie viral infecciosa. A expressão gênica é ausente ou muito restrita. Obviamente, a ausência de replicação viral resulta na absoluta ausência de sinais clínicos, caracterizando uma infecção totalmente subclínica e de difícil detecção.

A infecção latente pelos alfa herpesvírus é estabelecida principalmente em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos, para onde os nu-

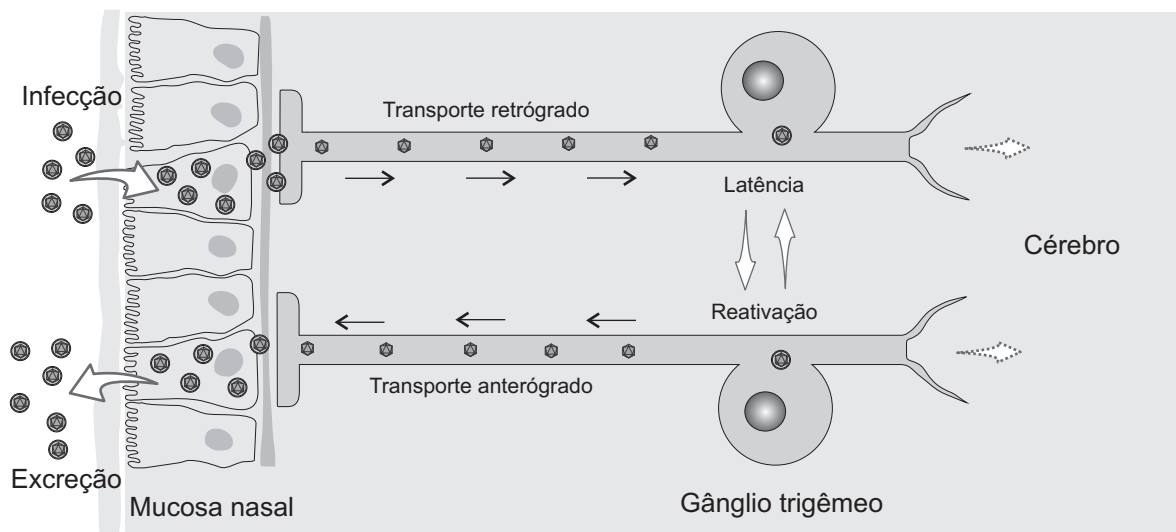


Figura 17.6. Patogênica da infecção latente dos alfa herpesvírus. Após a replicação primária, os nucleocapsídeos são transportados pelo fluxo axoplásmico retrógrado até os corpos neuronais localizados nos gânglios sensoriais e autonômicos. Nestes neurônios, o vírus replica produtivamente ou estabelece infecção latente. Sob certas condições, a infecção latente pode ser reativada e resulta em replicação produtiva. Os vírions produzidos são transportados de volta aos locais de replicação primária, onde replicam e são excretados. O acesso dos vírions ao encéfalo pode ocorrer tanto durante a infecção aguda quanto após a reativação.

cleocapsídeos são transportados pelos axônios ou dendritos após a replicação produtiva nas mucosas. Este transporte ocorre pelo fluxo axoplásmico retrógrado, através do qual os nucleocapsídeos atingem os corpos neuronais (Figura 17.6). Em determinadas classes de neurônios, a expressão dos genes alfa é suprimida precocemente. Como os produtos desses genes são necessários para as etapas seguintes de expressão gênica e replicação do genoma, o ciclo é interrompido (ver Figura 17.3). Como resultado, o genoma viral persiste no núcleo desses neurônios na forma episomal pelo resto da vida do animal.

A infecção latente é caracterizada pela presença do genoma sem expressão gênica significativa, replicação do genoma ou produção de progênie viral. Animais examinados durante a infecção latente não apresentam indícios de infecção, com exceção da presença de anticorpos produzidos em resposta à infecção aguda. Como todos os animais infectados ficam portadores, a detecção de anticorpos contra os herpesvírus indica a condição de portador de infecção latente.

Os principais sítios de latência são os gânglios sensoriais e autonômicos, dependendo do local de replicação primária do vírus. Assim,

infecções respiratórias ou orais resultam em colonização dos neurônios sensoriais do gânglio trigêmeo com o DNA viral. Os gânglios sacrais são os sítios de predileção para a infecção latente que se segue às infecções genitais. Além desses, alguns locais do sistema nervoso central (SNC) e periférico, além de tonsilas e linfócitos circulantes, dentre outros, podem abrigar o DNA viral latente. A importância desses sítios adicionais para a manutenção e reativação da latência ainda são desconhecidos.

Durante a maior parte do tempo, o genoma permanece inativo nos locais de latência, não ocorrendo produção e excreção de vírus infeccioso. No entanto, em situações geralmente associadas com estresse, a infecção latente é reativada. A reativação se caracteriza pela retomada da replicação lítica nos neurônios hospedeiros e produção de progênie viral. Os vírions produzidos são transportados pelas mesmas vias nervosas de volta aos sítios de infecção primária, onde o vírus replica produtivamente e é excretado (ver Figura 17.6). A reativação da infecção é, ocasionalmente, acompanhada de sinais clínicos e lesões nos locais de replicação, que correspondem aos sítios de infecção primária. A ocorrência de sinais clí-

nicos associada com a reativação é denominada recrudescência e, geralmente, é caracterizada por sinais mais brandos do que aqueles resultantes da infecção aguda. A recrudescência clínica, no entanto, parece não ser uma ocorrência freqüente nas infecções por todos os herpesvírus. Na maioria das vezes, a reativação não é acompanhada de manifestações clínicas evidentes.

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento, manutenção e reativação das infecções latentes pelos alfa herpesvírus têm sido exaustivamente estudados, porém muitos detalhes moleculares são ainda desconhecidos. O estabelecimento de latência depende da supressão precoce da expressão dos genes alfa, sem a qual prossegue o ciclo lítico. Durante a latência, um único transcrito viral é detectado nos neurônios infectados, denominado transcrito relacionado à latência (LAT ou LTR). Aparentemente, esse transcrito não é traduzido em proteína, e a sua função na manutenção e reativação da infecção latente permanece desconhecida. Sabe-se que a reativação experimental da infecção pela administração de corticosteróides é acompanhada da redução transitória da transcrição do LAT-LTR, o que sugere a participação desse transcrito na manutenção e reativação da latência. De qualquer forma, acredita-se que o LAT-LTR seja um componente importante, porém não o único, do mecanismo de latência dos alfa herpesvírus. Interações adicionais entre produtos virais e os neurônios, assim como a participação de mecanismos imunológicos, têm sido sugeridos para explicar a infecção latente.

É importante ressaltar que animais latente-mente infectados, que podem ser identificados por testes sorológicos, são considerados fontes potenciais de infecção, sendo muito importantes do ponto de vista epidemiológico, pois atuam como disseminadores do vírus.

6 Herpesvírus de interesse veterinário

A seguir, serão abordadas as principais doenças animais causadas por herpesvírus, dando ênfase àquelas que afetam animais de produção e de companhia. As doenças serão apresentadas por espécie animal, seguindo-se a ordem de classificação taxonômica das subfamílias.

6.1 Herpesvírus de bovinos

Dentre os herpesvírus de bovinos, destacam-se os vírus pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae*. O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) tem sido associado com doença respiratória, genital e abortos; o BoHV-2 é o agente da mamilitite herpética e o BoHV-5 é o agente da encefalite herpética (Figura 17.7). A espécie bovina também é hospedeira natural ou pode ser infectada naturalmente por herpesvírus que pertencem à subfamília *Gammaherpesvirinae*: o BoHV-4, o herpesvírus ovino tipo 2 (OvHV-2) e o herpesvírus alcelafino tipo 1 (AlHV-1). O OvHV-2 e AlHV-1 são os agentes etiológicos da febre catarral maligna (MCF). O AlHV-1 está associado com a forma africana da enfermidade, que acomete bovinos, cervídeos e outros ruminantes no continente africano, enquanto o OvHV-2 é o agente da MCF associada com ovinos, doença que acomete bovinos e outros ruminantes e possui distribuição mundial.

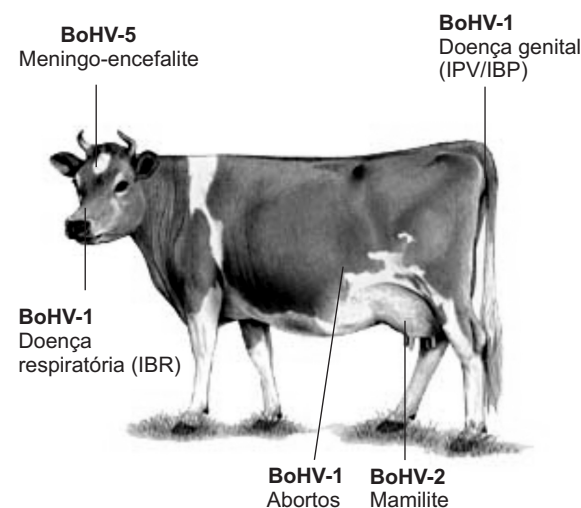


Figura 17.7 Alfa herpesvírus de bovinos e enfermidades associadas.

6.1.1 Herpesvírus bovino tipo 1

O BoHV-1 é um alfa herpesvírus e pertence ao gênero *Varicellovirus*. O vírus possui um genoma de aproximadamente 137 kbp, cuja sequência completa de nucleotídeos já foi deter-

minada. A organização do genoma do BoHV-1 – que pertence ao grupo D – está apresentada na Figura 17.2. O BoHV-1 tem sido associado com diversas manifestações clínicas em bovinos, que incluem a rinotraqueíte infecciosa (IBR), vulvovaginite pustular/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortos e infecção generalizada em neonatos (Figura 17.7.). Os isolados de campo do BoHV-1 podem ser subdivididos em três diferentes genótipos: 1 (BoHV-1.1), 2a (BoHV-1.2a) e 2b (BoHV-1.2b). Esta subdivisão em genótipos foi proposta com base em características genômicas e antigênicas. Entretanto, associações de determinados genótipos com certos quadros clínicos foram também evidenciadas. Assim, o BoHV-1.1 refere-se às amostras clássicas de vírus geralmente associadas com a doença respiratória (IBR). Esse subtipo tem sido freqüentemente isolado de casos de IBR, assim como de abortos, sendo prevalente em muitos países na Europa e nas Américas. O BoHV-1.2a tem sido associado a uma ampla variedade de manifestações clínicas, incluindo doença do trato genital (IPV e IPB), abortos e também infecções no trato respiratório. O BoHV-1.2a tem prevalência aparentemente elevada no Brasil, sendo o subtipo mais freqüentemente isolado nos laboratórios de diagnóstico virológico. Esse subtipo estava presente na Europa antes da década de 1970 e, após, tornou-se raro naquele continente. O BoHV-1.2b, por sua vez, tem sido associado com doença respiratória leve e IPV/IPB, mas até o presente não foi associado com abortos. Por isso, amostras do subtipo 2b são consideradas menos patogênicas do que as amostras do subtipo 1. Os vírus do subtipo BoHV-1.2b têm sido freqüentemente isolados na Austrália e Europa, mas são incomuns no Brasil, onde, até o presente, somente uma amostra desse subtipo foi identificada. Os isolados dos diferentes subtipos apresentam extensa reatividade sorológica cruzada, que pode ser evidenciada por testes de soroneutralização (SN). Nesses testes, o anti-soro produzido contra o vírus de um subtipo reage em títulos semelhantes ou iguais tanto contra o vírus homólogo como contra o vírus heterólogo.

6.1.1.1 Epidemiologia

O vírus causador da IBR foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1956. A partir de então, inúmeros estudos têm revelado a sua ampla distribuição em praticamente todo o mundo. Alguns países europeus, como a Dinamarca e a Finlândia, conseguiram erradicar a infecção, tendo obtido essa condição por meio da identificação e eliminação de animais soropositivos. Outros países, como a Alemanha e Suíça, têm implementado programas de erradicação do BoHV-1 por meio da vacinação compulsória dos rebanhos, identificação e eliminação gradual dos animais portadores.

No Brasil, o BoHV-1 foi isolado, pela primeira vez, de um caso de vulvovaginite na Bahia, em 1978. Vários relatos posteriores confirmaram a ampla distribuição do vírus no país, tanto pelo isolamento viral quanto pela detecção de anticorpos. Dados sobre prevalência de infecções pelo BoHV-1 demonstram variações entre 8 e 82% em várias regiões do país. É provável que exista atualmente, no Brasil, uma parcela muito pequena de rebanhos livres do BoHV-1 (ou BoHV-5, como será comentado a seguir). Estima-se, ainda, que o nível médio de prevalência da infecção nos rebanhos situe-se entre 30 a 70%. Para uma população bovina de aproximadamente 190 milhões de cabeças, pode-se estimar uma população potencialmente infectada de 57 a 133 milhões de cabeças.

As infecções pelo BoHV-1 podem ser transmitidas pelo contato direto e indireto entre animais, porque o vírus é disseminado através de secreções respiratórias, oculares e genitais, sendo excretado em grandes quantidades por animais durante a infecção aguda. Nessa fase, os animais excretam o vírus por até 15-16 dias em títulos de até 10^7 TCID₅₀/ml. Em casos de reativação da infecção latente, a excreção de vírus ocorre por um período menor (2 a 7 dias, geralmente) e em menores quantidades. Não obstante, a excreção viral que ocorre durante a reativação representa uma importante forma de transmissão e perpetuação do vírus na natureza. Por isso, os animais latente-

mente infectados são fontes potenciais de infecção para outros animais. As causas dos episódios de reativação permanecem parcialmente desconhecidas. No entanto, alguns fatores desencadeantes são notórios, como o estresse (p. ex.: induzido por transporte, desmame, descorne, parto, carências nutricionais graves ou excesso de trabalho) e aplicação de drogas imunossupressoras (p. ex.: corticosteróides).

O vírus pode, ainda, estar presente no sêmen de touros infectados, podendo ser disseminado tanto por monta natural como por inseminação artificial. A excreção pode ocorrer durante a infecção aguda ou nos episódios de reativação. A dose infecciosa mínima necessária para infectar uma fêmea foi calculada em torno 10^2 TCID₅₀. O sêmen é contaminado durante a ejaculação, e o vírus não é excretado de forma uniforme ou contínua por machos soropositivos. Logo, nem todas as amostras de sêmen de um touro portador terão vírus suficientes para infectar uma fêmea. Entretanto, todos os touros soropositivos devem ser considerados potenciais transmissores da infecção a fêmeas susceptíveis. Além do sêmen, o vírus tem sido eventualmente detectado no leite de vacas, chamando a atenção para mais este possível veículo de transmissão.

Apesar de os bovinos serem os principais reservatórios do BoHV-1, inquéritos sorológicos têm demonstrado a presença de anticorpos em diversas espécies de ruminantes silvestres, ovinos e caprinos. Além disso, ovinos e caprinos desenvolvem infecções agudas e latentes e são potencialmente capazes de excretar vírus quando submetidos à imunossupressão pela administração de corticosteróides. Além das espécies domésticas citadas, bubalinos também são considerados como potenciais reservatórios do BoHV-1. Entretanto, a sua importância na epidemiologia dos herpesvírus bovinos permanece desconhecida e merece ser investigada.

6.1.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a penetração na mucosa nasofaríngea ou genital, o vírus realiza uma replicação primária nas células epiteliais locais, provocando lise celular e levando ao aparecimento dos pri-

meiros sinais clínicos da infecção (congestão local, presença de secreções, lesões vesiculares ou erosivas). Durante essa fase, altos títulos virais são produzidos e excretados nas secreções, o que favorece a transmissão do vírus para outros animais.

Após a replicação inicial, o vírus invade as terminações nervosas de neurônios sensoriais e é transportado através de fluxo axônico retrógrado até os corpos neuronais nos gânglios regionais. Nesses locais, o vírus estabelece infecção latente, durante a qual não há expressão de antígenos virais ou replicação. Existem também evidências de que, após a infecção primária, o vírus possa realizar uma viremia, provavelmente associada a monócitos e linfócitos, através da qual o vírus poderia disseminar-se no organismo animal e causar infecções fetais e abortos.

Eventualmente, sob a influência de fatores externos, como estresse ou tratamento com glicocorticóides, pode ocorrer a reativação da infecção latente, ocasião em que ocorre a produção de partículas virais infecciosas nas células nervosas e o transporte dessas partículas de volta ao sítio de infecção primária. Nesses sítios, o vírus replica e é excretado em secreções, podendo ser transmitido para outros animais. A reativação da infecção latente pode, ocasionalmente, ser acompanhada de sinais clínicos geralmente moderados.

– Rinotraqueíte infecciosa bovina

A infecção respiratória pode apresentar-se de forma subclínica, leve ou severa, podendo resultar em morbidade de até 100%, com mortalidade geralmente ausente ou baixa (<5%). As manifestações clínicas incluem febre, depressão, anorexia, dispnéia, taquipnéia, tosse e descargas nasais serosas, que podem tornar-se mucopurulentas com a progressão da enfermidade e a ocorrência de infecções bacterianas secundárias. A inflamação local pode levar ao bloqueio das vias respiratórias superiores. Pela dificuldade respiratória, os animais tendem a forçar a respiração pela boca, levando à salivação abundante. A mucosa nasal pode se apresentar hiperêmica e com lesões vesiculares a erosivas. As erosões podem ser transitariamente recobertas com membranas fibrinosas. Em animais em lactação, ocorre que-

da na produção de leite. Em machos, pode haver prejuízos temporários à qualidade do sêmen, como anomalias morfológicas e funcionais dos espermatozoides.

O curso da enfermidade é rápido, e a recuperação clínica ocorre em até dez dias, caso não ocorram infecções bacterianas secundárias graves ou outras infecções virais associadas. Os animais afetados podem, ainda, apresentar conjuntivite uni ou bilateral que, em algumas circunstâncias, pode ser a única manifestação clínica da infecção.

Surtos de IBR são mais frequentemente observados em animais jovens e estão geralmente associados com situações de estresse e aglomeração de animais, incluindo eventos de transporte e confinamento. Outros agentes virais e bacterianos podem estar associados com o BoHV-1 nesses episódios de doença respiratória, genericamente chamados de “complexo respiratório de bovinos”. Os agentes virais frequentemente associados são o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da parainfluenza 3 (bPI-3V) e o vírus respiratório sincicial (BRSV), além de pasteurelas.

A infecção de fêmeas soronegativas gestantes, com amostras virais de alta virulência (BoHV-1.1 ou 1.2a), pode resultar em abortos, que ocorrem principalmente entre o quinto e oitavo mês da gestação. Os abortos ocorrem geralmente após um período de incubação de três a seis semanas, durante o qual o vírus alcança o feto durante a viremia. Até 25% das fêmeas em gestação de um rebanho podem abortar durante um surto, constituindo-se em uma importante causa de perdas econômicas nas criações de bovinos.

– Vulvovaginite pustular/balanopostite pustular

A maioria das infecções genitais por herpesvírus em bovinos estão associadas com amostras de BoHV-1.2b. A IPV aguda se desenvolve após a infecção do trato genital da fêmea durante a cobertura ou inseminação artificial. Pode, ainda, ocorrer por contato da mucosa com secreções contaminadas com o vírus. Após um curto período de incubação (1 a 3 dias), a vulva se apresenta hiperêmica, edemaciada e com vesículas distribuídas

na mucosa. As vesículas evoluem para pústulas, que podem coalescer e formar úlceras. As úlceras frequentemente ficam recobertas com material fibrinoso, de coloração branco-amarelada. Febre, anorexia e depressão podem estar presentes e podem ser agravadas por infecções bacterianas secundárias. Os animais apresentam dor ao urinar, apresentando a cauda erguida e frequentemente flexionada lateralmente. As lesões progridem até o 7º-8º dia pós-infecção, regredindo rapidamente a partir de então.

Em reprodutores machos infectados com o BoHV-1, as lesões desenvolvidas são semelhantes às descritas nas fêmeas. Após um período de um a três dias de incubação, a mucosa do pênis e/ou prepúcio apresenta-se hiperêmica e com pequenos pontos amarelados, que crescem e, eventualmente, coalescem, formando vesículas ou pústulas que, posteriormente, rompem-se, formando erosões ou ulcerações. Essas lesões ficam recobertas por material fibrinoso que pode recobrir extensas áreas da mucosa. Em casos graves, hemorragias podem ocorrer na mucosa peniana. Durante a fase aguda, o animal se recusa a montar, frequentemente exterioriza o pênis e apresenta corrimento prepucial. A enfermidade geralmente regride rapidamente após os dias 7-8 pós-infecção e, não havendo complicações, o animal apresenta cura clínica ao redor dos dias 10-14 pi. Em infecções naturais, o quadro clínico pode ser mais brando, com evolução mais rápida e sem complicações clínicas. Formas subclínicas da infecção genital também podem ocorrer, o que dificulta o diagnóstico e o controle da infecção.

6.1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção por herpesvírus bovinos é feito com base no histórico da propriedade, sinais clínicos e lesões observadas ao exame clínico. A suspeita clínico-patológica, no entanto, deve ser confirmada por exames laboratoriais. Durante infecções agudas, devem ser realizados testes para a detecção de vírus, antígenos ou DNA viral em amostras clínicas. As amostras geralmente utilizadas para a detecção de vírus são: suabes nasais e oculares, vaginais, de prepúcio ou coletadas das áreas com lesões

evidentes; tecidos (traquéia, pulmões) e fetos inteiros ou tecidos de fetos abortados (pulmões, fígado e rins). As amostras devem ser remetidas em gelo com a maior brevidade possível. Não é recomendado congelar as amostras a -20°C, pois esta temperatura pode inativar o vírus.

– Diagnóstico virológico

Um diagnóstico rápido pode ser realizado por imunofluorescência (IFA) com anticorpos específicos, em cortes ou impressões de tecidos ou, ainda, em esfregaços de secreções. Nesses casos, o resultado pode ser obtido dentro de uma a duas horas. Usualmente, além da IFA, suspensões de tecidos ou secreções são preparadas e inoculadas em cultivos celulares, visando ao isolamento do agente. Este é o procedimento padrão de diagnóstico virológico para o BoHV-1. Tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 produzem um efeito citopático (ECP) bastante evidente em vários tipos de células, incluindo cultivos primários e linhagens estabelecidas. Via de regra, os cultivos primários são mais sensíveis para o isolamento viral do que linhagens contínuas. Entretanto, em razão de maior praticidade, células de linhagem (p. ex.: células da linhagem de rim de bovino, MDBK) são as mais utilizadas para o isolamento viral. O BoHV-1 e BoHV-5 geralmente causam ECP visível entre 24 e 72 horas após a inoculação. Em alguns casos, quando a concentração de vírus no material original é muito baixa, pode ser necessário fazer mais de uma passagem do material inoculado. Raramente são necessárias mais do que duas ou três passagens. Ao final da terceira passagem, caso não haja evidência de ECP, o material é considerado negativo para vírus. Se houver ECP compatível com herpesvírus, a identidade do agente deve ser confirmada por IFA ou imunoperoxidase (IPX), utilizando-se conjugados ou anticorpos monoclonais apropriados.

A detecção de DNA viral em amostras clínicas por PCR também pode ser utilizada, apresentando as vantagens de rapidez, especificidade e sensibilidade. Esta técnica, no entanto, tem aplicação restrita para o diagnóstico de infecções agudas pelo BoHV-1. Possui aplicação importante na detecção da infecção latente, quando a pre-

sença do DNA viral nos sítios de latência pode ser o único e mais seguro indicativo da infecção.

– Diagnóstico sorológico

Caso não tenha sido possível obter amostras de tecidos ou secreções na fase aguda, a infecção pode ser diagnosticada por meio de testes sorológicos. Para tal, devem-se realizar duas coletas de soro: a primeira durante a fase aguda e a segunda três a quatro semanas após. Um aumento de quatro vezes no título de anticorpos entre as duas coletas é indicativo da infecção e pode confirmar o diagnóstico. Em fêmeas em reprodução, é conveniente fazer uma coleta de soro antes da gestação e manter a amostra congelada. Se houver qualquer problema reprodutivo de natureza infecciosa suspeita, uma nova coleta, após o surgimento do problema (p. ex.: aborto), deve ser realizada, sendo ambas as amostras remetidas ao laboratório.

Por outro lado, a detecção de anticorpos no soro, em um teste isolado, indica somente que o animal teve contato prévio com o agente, seja por infecção natural (ou seja, potencial portador) ou por vacinação. Portanto, a detecção de anticorpos em uma amostra isolada de soro possui significado limitado quando o objetivo é diagnosticar um evento de doença clínica.

As técnicas sorológicas mais utilizadas para o diagnóstico sorológico do BoHV-1 são o ELISA e a soro-neutralização (SN). É importante ressaltar que esses testes não são capazes de diferenciar os anticorpos produzidos contra o BoHV-1 daqueles produzidos contra o BoHV-5.

Além do seu uso como suporte à investigação clínica, esses testes têm sido amplamente utilizados em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos e triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen.

É importante enfatizar que a detecção de anticorpos contra o BoHV-1 – com exceção de anticorpos induzidos por vacinação – é indicativa da condição de portador.

A Tabela 17.2 apresenta um resumo das manifestações clínicas associadas com os herpesvírus bovinos, o material a ser enviado para o laboratório e as técnicas de diagnóstico utilizadas.

Tabela 17.2. Manifestações clínicas, material a ser coletado e técnicas utilizadas para o diagnóstico das principais herpesvíroses de bovinos

Manifestação	Agente provável	Material/diagnóstico	Diagnóstico laboratorial
Doença respiratória	BoHV - 1.1	Secreções nasais	1. Isolamento 2. Imunofluorescência (IFA) de células descamativas 3. PCR
		Tecidos (pulmão, traquéia)	1. Isolamento 2. Imunoistoquímica (IHC) 3. Histopatologia
		Soro pareado	1. Pesquisa de anticorpos (ELISA, SN)
Aborto	BoHV - 1.1	Tecidos fetais (tímo, baço, pulmão, traquéia, cérebro), placenta	1. Isolamento 2. PCR 3. IHC 4. Histopatologia
		Soro da vaca	Pesquisa de anticorpos
Vulvovaginite	BoHV - 1.2	Secreções vaginais, líquido de vesículas	1. Isolamento 2. PCR
		Soro pareado	Pesquisa de anticorpos
Balanopostite	BoHV - 1.2	Sêmen, secreções prepuciais	1. Isolamento 2. PCR
		Soro pareado	Pesquisa de anticorpos
Mamilitite	BoHV - 2	Líquido folicular, crostas	1. Isolamento 2. Microscopia eletrônica 3. IFA
Doença vesicular ou crostosa generalizada (PLSD)		Soro pareado	Pesquisa de anticorpos
Doença neurológica	BoHV - 5	Secreções nasais, cérebro	1. Isolamento 2. IFA 3. IHC 4. PCR 5. Histopatologia
		Soro pareado	Pesquisa de anticorpos

6.1.1.4 Controle e profilaxia

As medidas de controle em relação ao BoHV-1 devem ser relacionadas com a severidade da infecção no rebanho, práticas de manejo e com a prevalência da infecção. Em geral, podem-se adotar duas principais estratégias de controle, de acordo com a situação epidemiológica e histórico clínico dos rebanhos: controle com ou sem vacinação. Rebanhos com histórico comprovado da infecção, com sorologia elevada, sistemas de

recria e confinamento que agregam novilhos de várias procedências, além de propriedades com alta rotatividade de animais (compra-venda-transporte etc.) são recomendados a implementar a vacinação. Nessas situações, a vacinação contínua e regular pode reduzir a circulação de vírus e a ocorrência de doença clínica, reduzindo, conseqüentemente, as perdas econômicas.

Rebanhos de baixo risco, sem histórico da enfermidade/infecção ou sem sorologia positiva devem ser encorajados a implementar medidas de biossegurança para evitar a introdução da in-

fecção. Nesses casos, o simples teste (e descarte) de qualquer animal a ser anexado ao rebanho, aliado com testes sorológicos periódicos e descarte de eventuais positivos, geralmente são métodos efetivos. Recomenda-se testar reprodutores a serem anexados aos rebanhos e, no caso de serem positivos, deve-se evitar a sua introdução.

Rebanhos com sorologia alta, mas sem histórico clínico de doença respiratória ou genital, e sem problemas reprodutivos (retorno ao cio, infertilidade) podem ser mantidos sem vacinação, porém com monitoramento contínuo dos parâmetros produtivos e clínicos.

Além do uso de vacinas, outras medidas de controle incluem o teste de sêmen e reprodutores, o uso de sêmen e embriões livres de BoHV-1, bem como o monitoramento sorológico periódico dos rebanhos.

Centrais de coleta de sêmen deveriam – de maneira ideal – manter somente animais sorologicamente negativos para o BHV-1. No entanto, a frequente identificação de animais geneticamente superiores como soropositivos exige estratégias alternativas para que se possa utilizar o potencial genético sem o risco de disseminação da infecção. Nesses casos, o manejo separado desses animais e o teste de todos os ejaculados para assegurar-se da ausência do vírus são as medidas indicadas.

Vacinas convencionais atenuadas ou inativadas têm sido utilizadas para controlar a disseminação do vírus e reduzir a severidade da doença clínica e as conseqüentes perdas associadas ao BoHV-1. Vacinas com vírus vivo modificado têm sido produzidas por passagens múltiplas em cultivo celular ou por mutagênese induzida para produzir mutantes temperatura-sensíveis (TS). Vacinas tradicionais, com vírus vivo modificado de administração parenteral, oferecem risco de infecção fetal e abortamentos. Nesse sentido, a maior vantagem das vacinas intranasais TS é a indução de imunidade local e mais rápida, aparentemente sem o risco de infecção fetal.

Vacinas inativadas têm sido utilizadas principalmente em fêmeas prenhes pelo fato de as vacinas vivas representarem um risco potencial

ao feto. Uma das maiores desvantagens dessas vacinas é a necessidade de se associar adjuvantes para a obtenção de uma resposta adequada. Além disso, a magnitude e duração da imunidade conferida por essas vacinas são inferiores às vacinas vivas modificadas, o que exige revacinações freqüentes que aumentam o custo final.

As vacinas, se adequadamente administradas, podem conferir proteção adequada contra a enfermidade respiratória; sendo questionáveis, entretanto, na proteção contra a doença genital e abortos. Vacinas com vírus vivo modificado representam riscos potenciais para fêmeas gestantes. Nos casos em que a vacinação é recomendada, indica-se a manutenção de um alto nível imunitário através de vacinações periódicas e sistemáticas. As vacinas atuais também são incapazes de proteger contra o estabelecimento de latência com vírus de campo, ou seja, os animais vacinados podem se tornar latentemente infectados se forem posteriormente infectados.

Embora utilizadas com relativo sucesso na prevenção da enfermidade clínica e na redução da circulação de vírus na população, as vacinas tradicionais contra o BoHV-1 têm se mostrado incompatíveis com programas de erradicação. Com isso, surgiu a necessidade de se elaborar vacinas que permitissem a diferenciação de animais infectados (portadores da infecção latente) dos animais vacinados. Para suprir essa necessidade, surgiram as vacinas com marcadores antigênicos – as vacinas diferenciais. Essas vacinas baseiam-se na utilização de um vírus vivo atenuado, contendo uma ou mais deleções em genes que codificam proteínas não-essenciais. O uso desse vírus como vacina, associado a um teste sorológico que detecta anticorpos contra a proteína deletada, permite a distinção sorológica entre animais infectados e vacinados (Figura 17.8). Essa estratégia tem se constituído na base de programas de controle e erradicação do BoHV-1 em vários países europeus. Vacinas com essas características estão em fase de desenvolvimento no Brasil e devem estar disponíveis comercialmente em um futuro próximo.

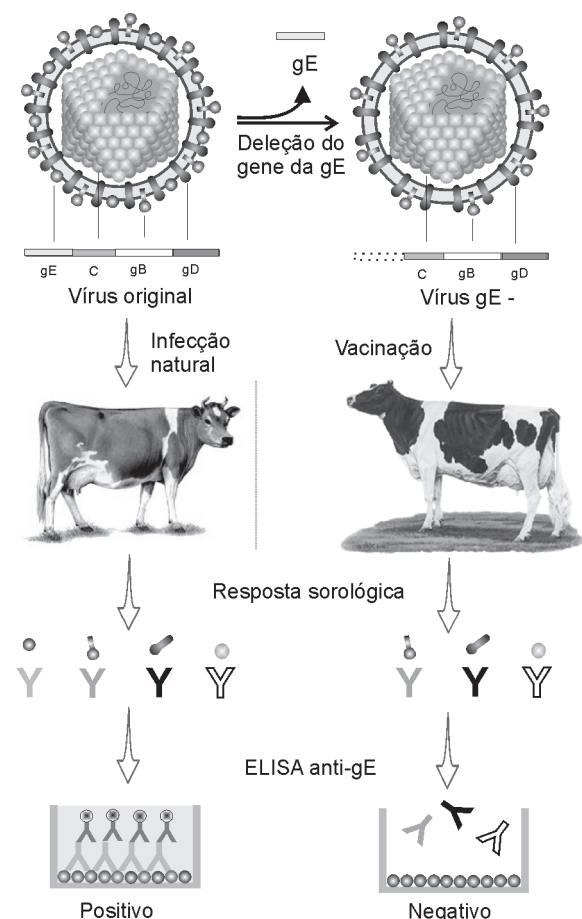


Figura 17.8. Princípio das vacinas com marcadores antigênicos para o BoHV-1. O gene que codifica uma glicoproteína é deletado do genoma por manipulação genética, originando um vírus mutante que não expressa esta proteína. Este vírus mutante é usado como vacina. O uso de um teste imunoenzimático específico que detecta anticorpos contra a glicoproteína deletada permite distinguir os animais vacinados (não reagem no teste) dos animais infectados com o vírus de campo (reagem positivamente no teste). O exemplo se refere à vacina diferencial contra o BoHV-1 em que o gene da glicoproteína E (gE) foi deletado.

6.1.2 Herpesvírus bovino tipo 2

O herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) é o agente da mamilita herpética, doença que possui repercussão sanitária em gado leiteiro, principalmente em regiões de clima temperado. A mamilita herpética (BHM) é a forma localizada da enfermidade, caracterizada por lesões nos tetos e no úbere. Em alguns casos, a doença se manifesta de forma generalizada, porém menos freqüente, chamada de *pseudo lumpy skin disease* (PLSD).

A forma generalizada – a PLSD – afeta a pele de todo o corpo, principalmente da cabeça, dorso e períneo.

O BoHV-2 é um típico alfa herpesvírus. Os vírions possuem envelope e contêm uma molécula de DNA de fita dupla como genoma. O genoma apresenta um alto grau de homologia com o vírus do herpes simplex humano (HHV-1 ou HSV). O BoHV-2 é classificado na subfamília *Alphaherpesvirus*, gênero *Simplexvirus*, do qual o HSV-1 é o protótipo. Os isolados de campo do BoHV-2 apresentam uma grande similaridade genética e antigênica entre si. Alguns aspectos da organização e seqüência do genoma têm sido muito estudados em razão deste vírus compartilhar vários determinantes antigênicos com uma série de proteínas codificadas pelo HSV-1 e HSV-2. Pela sua semelhança com esses vírus, especula-se que a provável origem do BoHV-2 seja de primatas e não de animais biungulados.

6.1.2.1 Epidemiologia

A infecção e doença associadas ao BoHV-2 já foram descritas em vários países e possuem alguma importância econômica, principalmente em gado leiteiro. A ocorrência de mamilita – mesmo de caráter transitório – pode resultar em perdas importantes devido à redução da produção de leite e à ocorrência de mastites. A enfermidade foi descrita no Brasil nas décadas de 1970 e 1980. Um estudo sorológico, realizado, em 2007, em duas importantes bacias leiteiras dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, revelou uma soroprevalência próxima a 30% em vacas em produção. Esses dados confirmam a presença e disseminação do vírus no rebanho brasileiro e corroboram observações de campo que revelam a ocorrência relativamente freqüente de doença clinicamente compatível com a causada pelo BoHV-2. A grande maioria dos casos que ocorrem a campo, no entanto, não é diagnosticada em nível laboratorial. A doença também já foi descrita em diversos países, incluindo o Kênia, EUA, Austrália, Reino Unido, Itália e Japão.

As formas generalizada ou localizada da doença têm sido relatadas em diferentes áreas geográficas. As infecções generalizadas de pele

tendem a ocorrer em áreas tropicais e subtropicais, onde, possivelmente, espécies de ruminantes selvagens podem ser reservatórios do agente. Anticorpos neutralizantes contra o BoHV-2 já foram detectados em elefantes, búfalos e ruminantes selvagens. A BHM é mais comum em gado leiteiro e em gado de corte submetido à exploração intensiva e sob condição de estresse. Vacas de primeira cria geralmente desenvolvem lesões mais severas e abundantes, que são registradas mais comumente durante o outono, quando a temperatura ambiental diminui. De fato, os relatos da enfermidade têm sido mais freqüentes em regiões que apresentam temperaturas baixas. O trauma físico pode ser um fator importante na patogenia das lesões pelo BoHV-2 e postula-se que as freqüentes rachaduras da pele das tetas que ocorrem durante o outono poderiam, ao menos parcialmente, explicar essa ocorrência sazonal das lesões. Aliado a esse fator, o edema fisiológico do úbere e tetas pode contribuir para o desenvolvimento das lesões.

A doença pode disseminar-se rapidamente entre os animais durante o outono e inverno. A forma de transmissão do vírus ainda não foi bem esclarecida, mas, provavelmente, ocorra por contato direto ou indireto, através de fluidos vesiculares e crostas contaminadas. A transmissão por meio de equipamentos de ordenha tem sido investigada, mas não há resultados conclusivos. A participação do ordenhador ou de insetos como vetores para a transmissão mecânica tem sido considerada, embora não tenha sido confirmada experimentalmente. Na fase aguda, o vírus pode ser transmitido aos bezerros durante a mamada, e estes animais podem desenvolver lesões vesiculares no focinho ou nas comissuras labiais.

O BoHV-2, provavelmente, estabelece infecção latente após a infecção aguda. Essa hipótese é reforçada pelo desenvolvimento freqüente de lesões nas tetas imediatamente após o parto, sem fontes externas de infecção. As alterações fisiológicas, que ocorrem próximo e durante o parto, promoveriam o estímulo para reativação natural. No entanto, a biologia da infecção latente por esse vírus necessita ser mais bem investigada.

6.1.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A presença de lesões na pele (abrasões e escarificações) provavelmente facilite a instalação da infecção. Após a penetração, o vírus replica nas camadas mais profundas da epiderme e na derme, onde a replicação viral produz células gigantes multinucleadas. O período de incubação, após inoculação experimental, varia entre quatro e nove dias. Os sinais iniciais se caracterizam por regiões hiperêmicas circulares ou irregulares, geralmente com bordas bem definidas, na pele das tetas e do úbere. A hiperemia é seguida de edematização, e essas áreas se apresentam salientes sobre a superfície da pele. As vesículas nem sempre são observadas, pois se rompem rapidamente e dão lugar a ulcerações superficiais bem definidas de pele, com rápida formação de crostas. As bordas das feridas são bem definidas e necróticas.

Em casos naturais, a lesão típica associada com a mamilite herpética caracteriza-se por uma depressão central na superfície dos nódulos, necrose superficial da epiderme e um período curto de evolução. As lesões são encontradas principalmente nas tetas, mas podem disseminar-se pelo úbere e região perineal. Os tetos infectados apresentam-se inicialmente edematosos e doloridos.

A doença é autolimitante, e as lesões não complicadas regridem rapidamente. A mastite é a seqüela mais comum, particularmente se a extremidade dos tetos está envolvida. Quando as lesões são difundidas ou complicadas por mastite ou, ainda, por infecções secundárias graves, a cicatrização é retardada.

Em rebanhos afetados em surtos naturais, a taxa de morbidade pode variar entre 18 e 90% e, embora a mortalidade seja baixa, as perdas devido à doença podem ser graves. As perdas se devem à incidência maior de mastite, redução na produção de leite em até 20%, descarte de algumas vacas por mamite grave, úlceras intratáveis e interferência com os procedimentos de ordenha.

A mamilite clínica pode ser reproduzida pela inoculação intradérmica ou cutânea do vírus nas tetas após escarificação da pele. A doença cli-

nicamente indistinguível da infecção natural foi reproduzida pela inoculação do vírus em ovelhas lactantes. O vírus foi inoculado pela via cutânea após a produção de abrasões na pele.

A forma cutânea da infecção (PLSD) apresenta ocorrência mais rara e é caracterizada por aparecimento súbito, com a formação de nódulos firmes, circulares e elevados distribuídos na pele. Os nódulos desenvolvem um aspecto característico: superfície plana com centro ligeiramente deprimido. Essas lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas usualmente são mais prevalentes na cabeça, pescoço, dorso e períneo. Depois de duas semanas, as lesões secam e, em duas a quatro semanas, desprendem-se do corpo do animal, levando consigo a superfície da pele e pêlos, os quais se reconstituem em poucos dias.

6.1.2.3 Diagnóstico

A ocorrência de mamilite vesicular ou crostosa em vacas leiteiras deve ter a sua etiologia investigada, pois outros agentes virais podem também estar envolvidos. Outras enfermidades de pele podem se manifestar de forma semelhante à mamilite herpética bovina. Dentre essas, podem ser citadas: urticária, picadas de inseto, infecções pelos vírus do *Pseudocowpox* e *Vaccinia*. Estas últimas são comuns no Brasil, principalmente na região Sudeste. Por isso, o diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser, sempre que possível, acompanhado de comprovação virológica e/ou sorológica (ver Tabela 17.2).

Para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo BoHV-2, são indicadas amostras de fluido vesicular, crostas e soro sanguíneo coletados durante a fase aguda da doença. As chances de isolamento são maiores quando o líquido vesicular é coletado antes da ruptura das vesículas. Em amostras coletadas das vesículas rompidas há algumas horas ou de lesões crostosas, dificilmente se consegue isolar o agente. Por isso, recomenda-se a coleta de fluido de vesículas íntegras, com o auxílio de seringas com agulhas finas. Alternativamente, o material pode ser coletado com suas-bes. Para o sucesso do isolamento, a temperatura

de conservação do material (4°C) também é crítica. Áreas de lesões podem ser incisadas e fixadas em formol 10% e enviadas para diagnóstico histológico ou microscopia eletrônica. As margens das lesões podem ser dissecadas, colocadas em meio essencial mínimo e enviadas para serem submetidas a exames virológicos.

O conteúdo de partículas do vírus pode ser muito alto no fluido de vesículas frescas, o que é característico de viroses vesiculares. O vírus presente pode ser propagado facilmente em cultivos celulares primários, assim como em linhas celulares já estabelecidas. Células primárias de bovinos e células de linhagem de rim bovino (MDBK) são indicadas para o isolamento e cultivo do vírus. Deve-se ressaltar que, quando a suspeita etiológica for BoHV-2, os cultivos devem ser incubados a 32°C, pois o vírus não replica bem a 37°C. Nas células de cultivo, o vírus produz ECP, caracterizado pela formação de massas celulares multinucleadas (sincícios) que aumentam em número e diâmetro à medida que se prolonga a incubação. Após poucos dias, os sincícios tornam-se confluentes, estendendo-se por todo o tapete celular, que acaba por se desprender da superfície dos frascos. Em estágios avançados, o vírus produz sincícios grandes, multinucleados, com inclusões eosinofílicas intranucleares. A identificação do BoHV-2 isolado em cultivos celulares – embora o ECP seja característico e inconfundível com outros vírus – pode ser feito por SN com soro hiperimune ou por IFA.

O BoHV-2 pode também ser identificado por ME após coloração negativa. A ME pode ser realizada em fluido vesicular obtido de lesões frescas ou em fragmentos de pele obtidos por biópsia. Além disso, um diagnóstico rápido pode ser realizado pela coloração de Giemsa em microscopia ótica, com material obtido por biópsia da periferia das lesões vesiculares recentes. Esse método permite a visualização de inclusões intranucleares.

O diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-2 pode ser realizado por SN ou ELISA em soros pareados. A sorologia tem aplicação quando se deseja detectar os portadores em uma população de bovinos, uma vez que a condição de soropositivo indica a infecção latente.

6.1.2.4 Controle e profilaxia

Experimentos utilizando vacinas inativadas e atenuadas do BoHV-2 falharam em demonstrar proteção contra a doença clínica. No entanto, inoculações parenterais, com isolados de campo, produzem lesões locais sem excreção do vírus e conferem uma imunidade sólida e duradoura. Existem protocolos descrevendo esses processos de imunização, utilizando material vesicular recente ou mesmo de vírus propagado no laboratório. No entanto, há risco da perpetuação do vírus pelo estabelecimento de infecções latentes em rebanhos nos quais esse método é utilizado. Atualmente, não existem vacinas comerciais disponíveis contra o BoHV-2.

Os métodos de profilaxia devem incluir medidas higiênicas da sala de ordenha e equipamentos, além do combate a insetos, possíveis vetores transmissores do agente. Outra medida profilática importante é evitar a entrada de animais estranhos e realização de quarentena para animais introduzidos no rebanho.

Uma vez instalada a infecção no animal, pode-se utilizar antibioticoterapia tópica, reduzindo, assim, as infecções bacterianas secundárias nas lesões. Para a desinfecção de ambientes e equipamentos, os desinfetantes à base de iodóforos parecem ser mais eficientes do que soluções à base de hipoclorito de sódio.

A utilização de agentes antivirais para tratamento de infecções por herpesvírus humanos estimulou pesquisas para investigar a eficiência destes sobre a replicação do BoHV-2. Alguns desses produtos podem ser promissores no tratamento dessas infecções, principalmente a vidarabina, que se mostrou mais eficiente do que o aciclovir.

6.1.3 Herpesvírus bovino tipo 4

O herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) é classificado na subfamília *Gammaherpesvirinae*, juntamente com o vírus do Epstein-Barr (EBV) de humanos e o herpesvírus saimiri (SHV), com o qual apresenta grande similaridade. Além da morfologia típica dos herpesvírus, o BoHV-4 possui um genoma de 144-150 kb, que contém uma região única de 108 kb e aproximadamente 15 repetições

de 1,5 a 3 kb nas extremidades. Com base em análise de restrição genômica, os isolados de campo podem ser divididos em dois grupos: o grupo da cepa DN-599, que abrange os isolados norte-americanos; e o grupo Movar 33/63, que abriga os isolados europeus. Alguns isolados europeus e asiáticos não se enquadram em nenhum desses grupos. Os padrões de clivagem enzimática do genoma do BoHV-4 diferem marcadamente dos outros herpesvírus de bovinos.

Os isolados de campo caracterizados até o presente não apresentam grande diversidade antigênica e, aparentemente, pertencem ao mesmo sorotipo. Apenas diferenças discretas podem ser detectadas com o uso de alguns anticorpos monoclonais (AcMs). O BoHV-4 não apresenta relação antigênica com os outros herpesvírus de bovinos.

A replicação do BoHV-4 em cultivos celulares é lenta e pouco eficiente, parecendo depender de células em divisão. Além de células bovinas, o vírus replica em determinadas células de origem humana.

6.1.3.1 Epidemiologia

A infecção pelo BoHV-4 parece estar amplamente distribuída na população bovina, embora o número de estudos sorológicos seja restrito. Até o presente, a infecção já foi diagnosticada na América do Norte, Europa e em alguns países africanos e asiáticos. Em alguns locais da África, a soroprevalência atinge 70% dos bovinos amostrados, enquanto na Bélgica foram observados índices de 15 a 30% e na Alemanha, de 18 a 38%.

Além de bovinos e ovinos, o vírus já foi isolado de gatos domésticos, o que constitui um achado incomum para os herpesvírus de ruminantes.

6.1.3.2. Patogenia, sinais clínicos e patologia

A patogenia da infecção pelo BoHV-4 é muito pouco conhecida, sobretudo pela escassez de relatos de doença natural e pela dificuldade de se reproduzir sinais clínicos pela inoculação experimental. A principal via natural de infecção pare-

ce ser a oronasal, pela inspiração de aerossóis ou por contato indireto com material contaminado. Foi também demonstrado que bezerros podem se infectar pela ingestão de leite contaminado. Após a infecção, o vírus replica na mucosa respiratória superior e no epitélio intestinal, podendo infectar leucócitos e se disseminar sistemicamente para vários órgãos e tecidos. Dentre os tecidos infectados durante a infecção aguda, incluem-se principalmente a mucosa do trato respiratório (nasal, traqueal e pulmonar) e o baço, com níveis inferiores de replicação nos linfonodos, rins, tonsilas e timo.

Após a infecção aguda, o BoHV-4 estabelece infecção latente em vários sítios, incluindo células mononucleares do baço e do sangue periférico, além do sistema nervoso. A persistência do vírus em células da linhagem monocítica-macrofágica sugere que a infecção pode induzir efeitos imunossupressivos. A reativação da infecção pode ocorrer em situações de estresse ou pode ser induzida pela administração de dexametasona.

Apesar de já ter sido isolado de bovinos com uma variedade de manifestações clínicas, ainda hoje não existe uma associação clara do BoHV-4 com determinada doença ou síndrome clínica. A reprodução experimental de doença em animais jovens ou adultos também não tem obtido sucesso.

O vírus foi inicialmente isolado na Hungria, em 1963, de bezerros com doença respiratória e ceratoconjuntivite e, posteriormente, nos Estados Unidos, de uma novilha com sinais respiratórios. Posteriormente o agente foi isolado de animais com conjuntivite, infecção do trato respiratório superior e pneumonia. Também foi identificado em animais com lesões cutâneas, dermatite mamária, enterite, metrite pós-parto e metrite crônica. A ocorrência de abortos com a demonstração do vírus no feto e em membranas fetais também já foi relatada. Existem relatos de associação do BoHV-4 com o BVDV em episódios de aborto.

A inoculação experimental do BoHV-4 em vacas em diferentes fases da gestação resultou em morte de alguns fetos e abortamentos entre o terceiro e quarto meses de gestação. Mumificação e autólise fetal foram observadas em dois fetos. O vírus foi isolado de quatro dos 12 fetos abortados

ou mumificados/autolisados. Fetos inoculados após o quarto mês nasceram vivos e saudáveis.

A associação do BoHV-4 com orquite, azoospermia e conjuntivite passageiras em touros também tem sido sugerida. Nesses casos, o vírus pode ser excretado pelo sêmen.

A associação do BoHV-4 com qualquer das manifestações mencionadas acima ainda é questionável, pois muitas tentativas de reprodução experimental da doença em bovinos e ovinos adultos falharam ou resultaram em sinais leves e inespecíficos. Coelhos têm sido utilizados com relativo sucesso como modelo experimental para o BoHV-4, sobretudo para o estudo da patogenia da infecção reprodutiva.

6.1.3.3 Diagnóstico e controle

O método de eleição para o diagnóstico é o isolamento viral, embora o BoHV-4 seja de difícil replicação em cultivos celulares de rotina (p. ex.: MDBK). Infelizmente, poucos reagentes específicos são disponíveis para a detecção de antígenos em tecidos e células. Para a detecção do BoHV-4 em tecidos e órgãos, deve-se recorrer a técnicas moleculares, como o *Southern blot* e PCR, pois seqüências genômicas estão disponíveis em bancos de dados e permitem a elaboração de sondas e *primers*.

Anticorpos contra o vírus podem ser detectados por imunodifusão em ágar (IDGA), fixação de complemento, imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA. A infecção natural geralmente não induz níveis altos de anticorpos neutralizantes, razão pela qual a técnica de SN não é recomendada. Não existem reagentes e *kits* diagnósticos comercialmente disponíveis, o que indica a necessidade do desenvolvimento de reagentes para o diagnóstico sorológico dessa virose.

Não existe consenso sobre possíveis medidas de controle a serem adotadas, em razão de que muito pouco é conhecido sobre essa infecção. Tentativas de diagnóstico de condições clínico-patológicas compatíveis com a infecção pelo BoHV-4 podem contribuir para um maior conhecimento sobre a infecção e possíveis consequências clínico-patológicas.

6.1.4 Herpesvírus bovino tipo 5

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é agente etiológico da meningoencefalite ou encefalite herpética bovina, doença geralmente fatal que afeta principalmente animais jovens. O BoHV-5 é muito semelhante ao BoHV-1 em diversos aspectos biológicos, genéticos e moleculares, de modo que a diferenciação desses dois vírus somente se tornou possível há, aproximadamente, 20 anos, com o desenvolvimento de técnicas moleculares. Até então, amostras de vírus atualmente reconhecidas como BoHV-5 eram consideradas subtipos do BoHV-1. Isso se dava em razão da grande similaridade entre os dois vírus, incluindo o efeito citopático produzido em cultivos celulares e a reatividade cruzada em testes de IFA, para antígenos virais, e de SN e ELISA, para anticorpos. No entanto, as diferenças clínico-epidemiológicas e moleculares existentes entre esses dois vírus justificaram a sua classificação como duas espécies virais distintas. Da mesma forma, alguns AcMs são capazes de distinguir entre BoHV-1 e BoHV-5, o que revela a existência de diferenças antigênicas entre esses vírus. Além disso, embora a estrutura e organização genômica sejam virtualmente idênticas e a homologia de nucleotídeos seja de aproximadamente 90%, a análise enzimática de restrição genômica e alguns protocolos de PCR podem diferenciar entre esses vírus. Ou seja, o BoHV-1 e BoHV-5 são muito semelhantes entre si em vários aspectos, porém apresentam diferenças bem definidas que podem ser detectadas por métodos específicos.

Ainda hoje, a maioria dos testes sorológicos e virológicos são incapazes de distinguir esses dois agentes. Por isso, a história natural do BoHV-5 ainda é pouco conhecida. Pode-se especular que alguns estudos epidemiológicos sobre o BoHV-1, realizados no passado, tenham confundido infecções causadas por esse vírus com aquelas causadas pelo BoHV-5. Assim, estudos adicionais são necessários para poder se avaliar com precisão a verdadeira amplitude das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 na população bovina.

O genoma do BoHV-5 (uma cepa brasileira, SV-507) foi recentemente seqüenciado e possui 138.4 kb, enquanto o genoma do BoHV-1 possui

aproximadamente 137 kb. O genoma desses vírus codifica mais de 70 produtos, entre os quais 10 a 12 glicoproteínas do envelope. Essas glicoproteínas desempenham importantes funções nas interações entre os vírions e as células hospedeiras e se constituem em importantes alvos para anticorpos neutralizantes.

Estudos clínico-patológicos e virológicos têm demonstrado que o BoHV-5 é um importante agente de encefalite bovina no Brasil. Em um estudo que investigou as causas de encefalite nesta espécie (cerca de 10% do total de casos registrados), os herpesvírus foram superados em incidência somente pela raiva. Como os herpesvírus isolados da maioria desses casos não foram tipificados, supõe-se que o BoHV-5 seja o principal implicado, embora ocasionalmente o BoHV-1 também possa estar envolvido em infecções neurológicas.

6.1.4.1 Epidemiologia

Em virtude da sua grande similaridade com o BoHV-1, a prevalência e distribuição da infecção pelo BoHV-5, mundialmente, é desconhecida. As infecções aparentes pelo BoHV-5 apresentam características epidemiológicas peculiares, afetando animais jovens, com baixa morbidade e elevada mortalidade. Como nas infecções por outros herpesvírus, em função da latência e da ocorrência de infecções subclínicas, a proporção de animais que desenvolve enfermidade clínica não é um indicador apropriado do número de animais efetivamente infectados. Curiosamente, a infecção parece ser causa de morbidade e mortalidade importante somente em países do Hemisfério Sul, embora tenha sido descrita no Hemisfério Norte há muito tempo. Até 1993, somente duas amostras de BoHV-5 haviam sido isoladas nos EUA. A baixa ocorrência de encefalites por herpesvírus em países do Hemisfério Norte, segundo alguns autores, poderia estar associada aos extensivos programas de vacinação contra o BoHV-1, cuja imunidade conferiria proteção também contra o BoHV-5.

Na atualidade, não é possível precisar a real prevalência e distribuição das infecções pelo BoHV-5, uma vez que não existem testes soroló-

gicos capazes de diferenciar entre infecções por BoHV-5 ou BoHV-1. É muito provável que uma proporção ainda desconhecida dos animais identificados como positivos para o BoHV-1 tenham sido de fato infectados pelo BoHV-5. Tal prevalência somente poderá ser determinada a partir da disponibilidade de testes sorológicos capazes de diferenciar infecções por BoHV-5 e BoHV-1.

Não obstante a dificuldade de se determinar a prevalência por testes sorológicos, relatos clínico-patológicos com ou sem confirmação virológica têm confirmado a ampla e crescente disseminação do BoHV-5 em rebanhos brasileiros. No Rio Grande do Sul, o BoHV-5 tem sido frequentemente associado com surtos de meningoencefalite. Com base em evidências clínicas (posteriormente confirmadas pelo isolamento do agente), a prevalência da infecção nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo parece elevada. No entanto, é impossível precisar esses dados, uma vez que a infecção pode ocorrer sem manifestações clínicas, sendo aparente somente aquela pequena proporção de casos em que os sinais são evidentes. Por essa razão, suspeita-se que a incidência do BoHV-5 seja significativamente maior do que os casos reportados. Além da possível da confusão com o BoHV-1, pela reatividade sorológica cruzada, os sinais de comprometimento neurológico semelhantes aos da raiva podem também conduzir a um diagnóstico equivocado.

Com ressalvas à prevalência e distribuição geográfica, a epidemiologia das infecções pelo BoHV-5 parece ser muito semelhante à do BoHV-1. Além de bovinos, infecções naturais já foram demonstradas em ovinos e caprinos, embora o seu significado epidemiológico seja desconhecido. Experimentalmente, a infecção aguda e latente pelo BoHV-5 pode ser reproduzida em ovinos, caprinos e coelhos.

Em infecções naturais e experimentais, o vírus é excretado nas secreções nasais em altos títulos e durante vários dias (até 15-18 dias). Em surtos naturais, a disseminação do vírus entre os animais parecer ser rápida, principalmente quando a densidade de animais é elevada. Os surtos ocorrem geralmente associados com situações de

estresse, ligadas ao desmame, transporte e mudança de alimentação. Esses surtos apresentam morbidade variável (1-10%) e letalidade elevada (próxima de 100%), ou seja, quase a totalidade dos animais que apresentam sinais neurológicos evolui para o óbito.

A transmissão do BoHV-5 provavelmente ocorra de modo semelhante à do BoHV-1, ou seja, por contato direto ou indireto entre animais. As secreções nasais representam o principal veículo para a transmissão do agente. A exemplo de outros herpesvírus, o BoHV-5 estabelece infecção latente em seus hospedeiros após a infecção aguda, o que contribui para a sua persistência na população bovina. Essa infecção pode ser reativada pela administração de corticóides, simulando o que provavelmente ocorra em condições naturais. As reativações naturais da infecção podem ser seguidas da recrudescência clínica e inclusive levar à morte, como sugerido pela ocorrência de casos isolados de encefalite pelo BoHV-5 em animais adultos

6.1.4.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A transmissão do vírus ocorre por contato direto ou indireto com animais ou secreções contaminadas. O vírus penetra pelo trato respiratório superior e replica inicialmente na mucosa nasal, onde a replicação persiste por até mais de 15 dias. A replicação na mucosa nasal é frequentemente associada com sinais respiratórios semelhantes aos observados nas infecções pelo BoHV-1, porém mais brandos. A seguir, o vírus invade os neurônios sensoriais regionais e é transportado através do fluxo axonal retrógrado para o gânglio responsável pela inervação da região (no caso das vias respiratórias, o gânglio trigêmeo), onde atinge os corpos neuronais. Neste gânglio, o vírus pode estabelecer dois tipos de relação com o hospedeiro. No primeiro caso, o vírus estabelece uma infecção latente, durante a qual não há replicação viral ou expressão de antígenos virais. Nesse caso, o animal permanece portador da infecção, porém sem apresentar sinais clínicos evidentes. Esse é, provavelmente, o resultado mais freqüente das infecções pelo BoHV-5.

A segunda possibilidade é que a replicação viral no gânglio trigêmeo seja seguida do transporte do vírus para o encéfalo, atingindo os neurônios de segunda ordem nos núcleos da ponte e bulbo. A partir desses sítios, o vírus pode disseminar-se ao cerebelo e tálamo, alcançando subsequente o córtex cerebral. Experimentalmente, foi observado que o vírus pode se distribuir de forma heterogênea pelas áreas do encéfalo. De sete bovinos inoculados com uma amostra de BoHV-5, quatro apresentaram o vírus disseminado em várias regiões do encéfalo; dois deles apresentaram o vírus em determinadas regiões (bulbo, ponte, mesencéfalo e córtex olfatório e frontal); enquanto outros dois continham o vírus somente no córtex olfatório e frontal. Dois animais inoculados foram aparentemente capazes de erradicar a infecção, o vírus não foi detectado em tecidos aos 21 dias após a infecção, apesar de ambos apresentarem lesões de meningoencefalite não-supurativa.

Estudos realizados em bovinos e coelhos infectados experimentalmente indicam que a via olfatória, pela qual o vírus atinge o córtex anterior através do sistema olfatório, constitui-se na via principal de acesso ao sistema nervoso central (SNC) a partir da replicação primária na mucosa nasal. Em coelhos, a via olfatória fornece um transporte muito mais rápido e eficiente do que a via trigeminal. De qualquer forma, a via trigeminal de transporte também é importante, pois permite ao vírus atingir o local de estabelecimento de latência.

Existem evidências de que as amostras de BoHV-5 apresentam diferentes níveis de neurovirulência. Estudos em bovinos e coelhos revelaram variações na neuroinvasividade (a capacidade do vírus de invadir, multiplicar e distribuir-se no SNC), assim como na neurovirulência (capacidade do vírus de provocar lesões no SNC).

A doença neurológica pelo BoHV-5 pode ocorrer em forma de surtos ou acometer em animais isolados. A enfermidade é mais freqüente em bezerros, sobretudo aqueles submetidos ao estresse da desmama e confinamento. Os sinais observados em casos naturais são: depressão, andar cambaleante, bruxismo, protusão da língua, salivação, flexionamento do pescoço, opistótono,

cegueira, pressionamento da cabeça contra anteparos, ataxia, decúbito, convulsões. Frequentemente esses sinais manifestam-se em crises, cujos espaçamentos e intensidade intensificam-se gradativamente. Esses sinais nem sempre estão presentes em todos os casos e diferentes combinações de sinais, com intensidades diferentes, têm sido relatados. Em alguns casos, uma depressão profunda é o único sinal evidente. Na grande maioria dos animais que apresenta sinais neurológicos, a enfermidade progride para o óbito, embora casos de recuperação após sinais moderados tenham sido descritos. O curso clínico dura de poucas horas (8-12) a vários dias e culmina com decúbito, convulsões e morte. Sinais respiratórios (hiperemia, corrimento nasal, dificuldade respiratória) têm sido relatados tanto em infecções naturais como experimentais. Abortos também têm sido relatados em rebanhos acometidos de surtos de infecção neurológica. Embora atualmente se acredite que a grande maioria dos casos de doença neurológica historicamente atribuídos ao BoHV-1 – pela confusão em sua identificação – tenham sido de fato causados pelo BoHV-5, alguns casos de doença neurológica comprovadamente causados pelo BoHV-1 também já foram relatados.

É possível também que o BoHV-5 possa produzir infecções genitais, pois o vírus já foi isolado de sêmen de touros e de episódios de aborto. Já foi demonstrado que o vírus, associado a uma pequena percentagem de monócitos e linfócitos periféricos, pode produzir uma viremia transitória. Esta seria uma das possíveis explicações para a origem das infecções fetais e abortos. No entanto, estudos para definir a patogenia desse tipo de quadro ainda não foram realizados.

É consensual que a reativação da infecção latente pelos herpesvírus animais raramente cursa com sinais clínicos. No entanto, o desenvolvimento de sinais clínicos discretos, a exemplo do que ocorre com outros herpesvírus, parece não ser tão raro, e a sua detecção depende de um exame mais acurado. No caso do BoHV-5, foi demonstrado que tanto a reativação natural quanto a induzida por dexametasona parecem ser freqüentemente acompanhadas de sinais neurológicos, que podem ser moderados e passageiros

ou progressivos e fatais. A reativação da infecção latente acompanhada de recrudescência clínica podem explicar os casos de meningoencefalite pelo BoHV-5 em que um único animal do rebanho, geralmente adulto, é afetado.

6.1.4.3 Diagnóstico

Doença neurológica de curso fatal, principalmente em bezerros, é sugestiva de infecção pelo BoHV-5. Nesses casos, o diagnóstico diferencial de raiva, listeriose, babesiose e encefalopatia espongiiforme deve ser realizado. O diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser, sempre que possível, acompanhado de comprovação virológica e/ou sorológica (ver Tabela 17.2). Em casos de doença neurológica em bovinos, o material enviado para o laboratório de virologia (cérebro) é inicialmente testado para a raiva e, se negativo, deve ser testado para o BoHV-5. Utilizando-se o cérebro suspeito, pode-se realizar vários testes para comprovar a etiologia: a) IFA ou IPX em impressões frescas de tecido nervoso; b) isolamento viral; c) PCR; d) nos casos em que secreções nasais acompanham a amostra, a realização de IFA no sedimento das células descamativas pode fornecer um diagnóstico rápido e confiável.

Para isso, amostras de cérebro e bulbo olfatório devem ser remetidas resfriadas para tentativas de isolamento viral e/ou IFA. Fragmentos de cérebro, acondicionados em formol a 10%, são úteis para exames histológicos. Encefalite não-suprativa, infiltração linfocitária perivascular, gliose focal ou difusa e corpúsculos de inclusão nos neurônios são achados comuns em casos de encefalite pelo BoHV-5. Secreções nasais e/ou brônquicas e pulmonares também são úteis para o diagnóstico. Amostras de soro pareadas, coletadas dos animais que, eventualmente, recuperem-se da doença neurológica podem auxiliar na elaboração do diagnóstico.

A técnica padrão de diagnóstico do BoHV-5 é o isolamento viral em cultivo celular – no qual o vírus produz ECP típico de herpesvírus – seguido de confirmação por IFA ou IPX. Em amostras clínicas conservadas de forma imprópria, no entanto, o isolamento do vírus pode ser problemático. Nesses casos, deve-se recorrer a técnicas de

detecção de antígenos ou PCR, pois as chances de se obter um resultado confirmatório são maiores.

A confirmação da identidade do agente – e a sua diferenciação do BoHV-1 – pode ser realizada por reatividade com determinados AcMs, análise de restrição genômica e PCR diferencial, seguida ou não de sequenciamento do produto.

O exame histológico de seções do SNC também é utilizado no diagnóstico e, geralmente, revela quadros de encefalite não-suprativa, infiltração linfocitária focal ou difusa e manguitos perivasculares. Em alguns casos, o exame histológico do cérebro revela alterações bem indicativas de infecção herpética, como a presença de corpúsculos de inclusão e necrose neuronal. No entanto, essas alterações nem sempre estão presentes, indicando a necessidade de exames virológicos para confirmar a identidade do agente. Casos de infecção neurológica pelo BoHV-5 sem quaisquer alterações histológicas também já foram descritos.

Amostras pareadas de soro, coletadas durante a doença aguda e 14-21 dias após, podem ser submetidas a testes sorológicos. Um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos é indicativo da infecção aguda. Os testes sorológicos mais comumente utilizados são SN e ELISA. A SN fornece quantificação dos anticorpos neutralizantes, enquanto o ELISA é apenas qualitativo: positivo ou negativo. Cabe enfatizar que esses testes são incapazes de diferenciar anticorpos anti-BoHV-5 de anticorpos anti-BoHV-1.

6.1.4.4 Controle e profilaxia

Devido às semelhanças biológicas e epidemiológicas, as medidas de controle e profilaxia para o BoHV-5 são essencialmente as mesmas preconizadas para o BoHV-1. Não existem, até o presente, vacinas específicas contra o BoHV-5 disponíveis no mercado. Entretanto, com base na reatividade cruzada entre o BoHV-1 e BoHV-5, vacinas contra BoHV-1 vem sendo utilizadas no controle da meningoencefalite por BoHV-5. No entanto, o nível de proteção heteróloga conferido por essas vacinas permanece indeterminado.

6.1.5 Herpesvírus associados com a febre catarral maligna

Os agentes etiológicos da febre catarral maligna (MCF) são o herpesvírus ovino tipo 2 (OvHV-2) e o herpesvírus alcelafino tipo 1 (AIHV-1), membros do gênero *Rhadinovirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae*. O AIHV-1 está associado com a forma africana da enfermidade, que acomete bovinos, cervídeos e outros ruminantes no continente africano. O OvHV-2 é o agente da forma da MCF associada a ovinos, doença que acomete bovinos e outros ruminantes e possui distribuição mundial.

6.1.5.1 Epidemiologia

– Forma africana

Os hospedeiros naturais do agente da forma africana da MCF e transmissores para outras espécies são os *gnus* (*Conochaetes taurinus* e *Conochaetes gnu*, em inglês, denominados *wildebeest*). No organismo desses animais, o vírus encontra-se fortemente associado com células, sendo raramente transmissível entre animais adultos. Entretanto, a administração de corticosteróides, assim como a ocorrência de estresse (por exemplo, transporte para zoológicos) pode induzir a excreção de vírus. No período perinatal, o vírus pode ser detectado em secreções nasais, oculares e nas fezes de neonatos. Durante as temporadas de parição dos *gnus*, os povos africanos que convivem com esses animais acreditam que o vírus seja transmitido para bovinos pelo contato com a placenta, secreções placentárias ou pelas secreções dos recém-nascidos.

– Forma não-africana

A forma não-africana da MCF é uma doença infecciosa sistêmica que ocorre em bovinos e outros ruminantes domésticos e silvestres, podendo ocorrer também em suínos. O OvHV-2 – agente etiológico dessa forma – apresenta a espécie ovina como hospedeira natural. Nestes animais,

a infecção ocorre predominantemente de forma subclínica. Essa forma, também denominada MCF associada a ovinos (MCF-OA), possui ocorrência esporádica e tem sido descrita em vários países da Europa, América do Sul, América do Norte e em outras regiões. Em regiões endêmicas, a MCF-OA pode ocorrer de forma esporádica ou em surtos, com a ocorrência de um número variável de casos. No Brasil, a enfermidade tem sido documentada em bovinos desde 1924, nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul.

O OvHV-2 produz uma infecção subclínica nos ovinos, seus hospedeiros naturais. Os ovinos disseminam o vírus durante a parição, e o agente penetra nos bovinos provavelmente pela via respiratória. Além de ovinos, cabras e animais silvestres, como cervídeos, podem ser portadores do vírus e transmiti-lo para bovinos. Com o advento de técnicas moleculares de diagnóstico, como a PCR, foi possível estabelecer que bovinos que eventualmente se recuperam da MCF-OA tornam-se portadores crônicos.

6.1.5.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A patogenia da infecção ainda é pouco conhecida. Os animais infectados apresentam uma viremia associada com células e a presença de vírus nas lesões, que são provavelmente imuno-mediadas. O período de incubação varia entre 3 e 10 semanas, e a duração da doença clínica é de 3 a 7 dias. Os eventos centrais da patogenia da MCF parecem envolver a infecção e perda da regulação funcional de determinadas populações de linfócitos. A perda da atividade dos linfócitos supressores facilitaria a proliferação linfóide observada na doença, enquanto a atividade descontrolada das células NK seria responsável pela destruição tecidual. Embora a infecção aguda seja provavelmente seguida do estabelecimento de latência, não existem evidências de reativação e recrudescência clínica.

Os sinais clínicos da MCF incluem apatia, anorexia, febre, opacidade da córnea, corrimento

Tabela 17.3. Principais achados clínico-patológicos em surtos de febre catarral maligna diagnosticados no Rio Grande do Sul.

Relato N°	N° animais			Sinais clínicos
	Expostos	Doentes	Mortos	
(1)	20	1	1	Opacidade da córnea, cegueira, ulceração no focinho e mucosa oral, incoordenação motora, decúbito.
(2)	70	1	1	Febre, opacidade da córnea, corrimento nasal e ocular seroso, erosões labiais, distúrbios nervosos.
(3)	500	12	12	Febre, opacidade da córnea, edema das pálpebras, hiperemia da mucosa nasal e conjuntiva, corrimento nasal e ocular seroso ou mucopurulento, diarreia, linfadenopatia, distúrbios nervosos.
(4)	15	1	1	Opacidade da córnea, corrimento ocular seroso, diarreia.
(5)	n.i.	1	1	Separação do lote, opacidade da córnea, distúrbios nervosos.
(6)	170	80	15	Febre, opacidade da córnea, edema das pálpebras, hiperemia da mucosa nasal e conjuntiva, corrimento nasal e ocular seroso ou mucopurulento, erosões labiais, sialorréia, erosões e corrimento vulvar, hematúria, diarreia, linfadenopatia, distúrbios nervosos.
(7)	n.i.	1	1	Opacidade da córnea, corrimento nasal e ocular mucopurulento, necrose do ápice das papilas bucais, desprendimento da capa córnea dos cascos e dígitos acessórios.
(8)	480	12	12	Distúrbios nervosos.
(9)	n.i.	1	1	Febre, anorexia, diarreia, distúrbios nervosos.
(10)	n.i.	100	100	Não informado.
(11)	7	1	1	Opacidade da córnea, corrimento nasal e ocular mucopurulento, erosões na mucosa oral, hematúria.
(12)	41	3	3	Corrimento nasal, erosões no focinho, sialorréia.
(13)	470	29	29	Opacidade da córnea, diarreia, distúrbios nervosos.
(14)	1	1	-	Febre, opacidade da córnea, hiperemia da conjuntiva, corrimento nasal purulento, desprendimento do epitélio nasal e do focinho, erosões na mucosa oral, sialorréia, desprendimento da capa córnea dos cascos e dígitos acessórios, linfadenopatia, distúrbios nervosos.
(15)	200	40	40	Opacidade da córnea, edema das pálpebras, hiperemia da mucosa nasal e conjuntiva, corrimento nasal mucopurulento, sialorréia, hiperemia e exsudato fibrinonecrótico na mucosa do prepúcio, distúrbios nervosos.

Fonte: adaptada de Rech et al. (2005).

nasal mucopurulento, salivação, diarreia, úlceras orais e nasais, ceratoconjuntivite, linfadenopatia, diarreia, distúrbios nervosos com movimentos de pedalagem, convulsões e exantema cutâneo.

Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos afetados em 15 propriedades, onde ocorreram casos isolados ou surtos de MCF no Rio Grande do Sul, estão apresentados na Tabela 17.3. Nesses episódios a doença apresentou um curso agudo ou subagudo e foi, na maioria das vezes, fatal.

As lesões macroscópicas envolvem principalmente os tratos digestivo, respiratório superior e urinário, além de linfonodos, fígado, olhos e encéfalo, e incluem lesões erosivo-ulcerativas em várias mucosas. As lesões observadas no aparelho digestivo e respiratório estão associadas com estomatite, faringite e laringite. Ocorre um aumento generalizado de volume dos linfonodos, que podem apresentar aspecto hemorrágico. Lesões oculares, como opacidade da córnea, podem ser frequentes. Histologicamente, as lesões consistem de vasculite com necrose fibrinóide, infiltrados mononucleares em vários órgãos, hiperplasia linfóide e necrose dos epitélios de revestimento. Essas lesões são consideradas patognomônicas ou muito características da doença. Pode ocorrer edema de meninges e formação de manguitos perivasculares em diferentes regiões do cérebro. Focos necróticos podem ser observados nos rins e fígado. Há vasculite generalizada. A maioria dos animais infectados que desenvolvem a forma mais grave da doença morre em, aproximadamente, 10 dias.

6.1.5.3 Diagnóstico e controle

O diagnóstico presuntivo da MCF é baseado nos sinais clínicos e nas lesões encontradas à necropsia, e a presença de ovinos na propriedade é um dado que auxilia o diagnóstico. O diagnóstico definitivo da doença pode ser realizado pelo uso de testes sorológicos, detecção de antígenos virais por IFA ou IHC, isolamento viral (para o AIHV) e por PCR. As amostras a serem utilizadas para detecção do vírus e/ou DNA viral são: leucócitos frescos, tecido da tireóide e glândula adrenal. A detecção de anticorpos é realizada em

amostras de soro de animais enfermos. A replicação eficiente do OvHV-2 em cultivos celulares ainda não foi obtida, por isso o isolamento viral não é utilizado no diagnóstico.

A tríade de alterações histológicas da MCF consiste de vasculite, acúmulos de células inflamatórias mononucleares em vários tecidos e necrose dos epitélios de revestimento. Na vasculite, ocorre necrose fibrinóide da parede de artérias e veias e infiltração de linfoblastos, linfócitos e macrófagos na média, adventícia e espaço perivascular. Essas lesões estavam presentes em todos os casos de MCF em bovinos deste estudo e são altamente sugestivas da doença.

O diagnóstico diferencial da MCF em bovinos inclui outras doenças a vírus, como a febre aftosa, estomatite vesicular, diarreia viral bovina/doença das mucosas, língua azul e peste bovina.

Considerando-se a forma de transmissão do OvHV-2 para bovinos, a principal medida de controle é evitar a criação conjunta de ovinos e bovinos. Uma alternativa é separar os ovinos durante a parição, de modo a evitar a transmissão a bovinos através de placentas e fluidos fetais. Além disso, devem-se isolar bovinos afetados de bovinos sadios. Não há vacinas disponíveis contra a MCF.

6.2 Herpesvírus de caprinos

6.2.1 Herpesvírus caprino tipo 1

O herpesvírus caprino tipo 1 (CpHV-1) é um alfa herpesvírus estreitamente relacionado com o BoHV-1. Esse vírus está associado com quadros de enterite e infecção generalizada fatal em cabritos recém-nascidos (até duas semanas de idade). A maioria das infecções em animais adultos é subclínica, mas a infecção pode, ocasionalmente, resultar em sinais respiratórios, conjuntivite, vulvovaginite, balanopostite e abortos. Outro vírus caprino (CpHV-2), que pertence à subfamília *Gammaherpesvirinae*, tem sido recentemente associado com manifestações compatíveis com a febre catarral maligna (MCF) em algumas espécies de cervídeos. Esse vírus aparentemente não causa doença em caprinos, que, provavelmente, se constituem em seus hospedeiros naturais.

A susceptibilidade dos caprinos ao herpes-vírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e a ocorrência da infecção nessa espécie, além do quadro clínico semelhante induzido por ambos os vírus nas respectivas espécies, tornou bastante difícil a classificação do CpHV-1 como um vírus distinto. As caracterizações iniciais demonstraram que o vírus de caprinos (CpHV-1) distingue-se do BoHV-1 por apresentar um ciclo replicativo mais curto, evidenciado por uma destruição mais rápida do cultivo celular *in vitro*; por sorologia cruzada unidirecional e por análise de restrição enzimática do genoma. Embora não existam diferenças significativas nas propriedades físico-químicas de seus DNAs, a análise de restrição demonstra claramente que o CpHV-1 e o BoHV-1 são espécies virais diferentes. No entanto, apesar de serem diferentes em seus mapas de restrição, ambos os vírus parecem ter mantido ou desenvolvido uma relação antigênica durante a sua evolução.

6.2.1.1 Epidemiologia

O CpHV-1 foi inicialmente isolado na Califórnia, em 1975, de quadros de enterite severa em cabritos com poucos dias de vida. Posteriormente, o vírus foi detectado em rebanhos caprinos na Suíça. Embora a distribuição do agente não tenha sido investigada, estudos sorológicos e virológicos demonstram que a infecção está presente em vários países europeus, Austrália, Nova Zelândia, Canadá e Estados Unidos, em níveis de prevalência variáveis. Em países que possuem a caprinocultura comercial bem desenvolvida, como a Grécia e a Itália, os níveis de prevalência podem atingir entre 30 e 50% dos animais.

Embora a infecção pelo CpHV-1 tenha sido descrita somente nos hospedeiros naturais, o CpHV-1 possui a capacidade de infectar espécies heterólogas. Anticorpos contra o CpHV-1 já foram detectados em algumas espécies silvestres, especialmente cervídeos. Cordeiros e bezerros inoculados experimentalmente não desenvolvem sinais clínicos, porém replicam o vírus e apresentam soroconversão. A exemplo do BoHV-1, que replica e estabelece infecção latente passível de reativação em cabras, o CpHV-1 é capaz de re-

plicar e estabelecer infecção latente em bovinos após infecção experimental. O possível papel dessas outras espécies na epidemiologia da infecção permanece desconhecido.

6.2.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A patogenia da infecção pelo CpHV-1 não está totalmente esclarecida. Em condições naturais, o CpHV-1 produz infecção primária que evolui para a infecção latente passível de reativação. O CpHV-1 pode iniciar a infecção pelas vias nasal e genital. Quando a infecção ocorre pela via nasal, o vírus replica localmente e dissemina-se por viremia para o trato genital, onde pode causar aborto. Quando a penetração ocorre na mucosa genital, o vírus apresenta replicação local e, aparentemente, não se dissemina para outros órgãos e tecidos.

Após a infecção primária, o CpHV-1 estabelece infecção latente nos 3º e 4º gânglios sacrais e no gânglio trigeminal, dependendo da via de penetração. A reativação do vírus dos sítios de latência tem sido muito difícil de ser demonstrada, tanto em infecções naturais como experimentais. Em condições naturais, a reativação e excreção do vírus pela via genital têm sido observadas em cabras com títulos baixos de anticorpos neutralizantes (≤ 4) durante as estações de monta, provavelmente como resultado de um estresse decorrente das alterações hormonais associadas com o estro. Experimentalmente, a reativação e excreção viral foram obtidas somente após a administração de altas dosagens de dexametasona. Após reativação da infecção latente, o CpHV-1 apresenta um comportamento similar ao da infecção primária: animais infectados pela via intranasal excretam o vírus pelas vias nasal e genital, enquanto os animais infectados pela via genital geralmente eliminam o vírus somente por esta via.

Os sinais clínicos decorrentes da infecção pelo CpHV-1 são compatíveis com infecção no trato gastrointestinal, genital e respiratório. Embora a infecção seja subclínica na maioria dos animais adultos, sinais inespecíficos, como hipertermia e leucopenia, têm sido descritos. Também têm sido descritos quadros de vulvovaginite, caracteriza-

dos por edema vulvar, eritema, erosões, úlceras e descarga mucopurulenta. Diarréia, conjuntivite, descarga nasal, tosse e dispnéia também têm sido ocasionalmente observadas. Em caprinos jovens (entre uma e duas semanas de idade), o CpHV-1 é responsável por infecção sistêmica, caracterizada por lesões ulcerativas no trato gastrintestinal, geralmente associadas com alta morbidade e mortalidade.

O tropismo seletivo do CpHV-1 pelo trato genital, a latência nos gânglios sacrais e reativação da infecção latente, coincidente com o estro, sugerem que a disseminação do vírus dentro do rebanho é provavelmente promovida pela monta natural.

6.2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo CpHV-1, em casos clínicos suspeitos, pode ser realizado pelo isolamento do agente em células primárias ou contínuas de origem caprina ou ovina. O vírus produz ECP semelhante aos outros alfa herpesvírus. Conjugados policlonais contra o BoHV-1 produzem reação cruzada em testes de IFA e podem ser utilizados diretamente em tecidos ou em células de cultivo inoculadas. Uma vez isolado, o CpHV-1 pode ser diferenciado do BoHV-1 por análise de restrição enzimática.

Episódios de aborto têm sido investigados pelo uso de PCR com *primers* específicos em tecidos de fetos abortados. Anticorpos contra o CpHV-1 podem ser investigados por SN ou ELISA, e a realização de sorologia pareada pode indicar infecção aguda recente. Esses testes também têm sido utilizados em inquéritos sorológicos em rebanhos caprinos e em animais silvestres.

6.2.1.4 Controle e profilaxia

Em virtude da ampla distribuição do CpHV-1 e das perdas econômicas decorrentes de abortos, natimortos e problemas reprodutivos, algumas medidas para prevenção ou erradicação têm sido preconizadas. Apesar de ainda não existirem vacinas comerciais disponíveis, tentativas de se produzir uma vacina que reduza a severidade da doença e a disseminação da infecção dentro do

rebanho têm sido realizadas. Os resultados mais promissores foram obtidos com o uso de uma vacina inativada, porém o nível de proteção parece depender da via do desafio. Ou seja, a proteção foi mais sólida nos animais desafiados pela via nasal, quando comparada com os desafiados pela via genital, que é a rota mais provável de infecção natural. Uma vacina contra o BoHV-1 foi testada em cabras e conferiu proteção parcial após o desafio com o CpHV-1.

Considerando-se que os caprinos infectados tornam-se portadores latentes após a infecção aguda, medidas como triagem e identificação de positivos seguida de descarte ou isolamento, para evitar a transmissão a outros animais, assim como o teste de novos animais introduzidos nos rebanhos, podem auxiliar a reduzir a circulação do vírus e a incidência da infecção nos rebanhos.

A susceptibilidade de cabras e bovinos ao CpHV-1 e BoHV-1, os títulos nos quais os vírus são excretados pelos hospedeiros heterólogos e o contato estreito entre bovinos e cabras em criações consorciadas sugerem que a infecção cruzada natural pode ocorrer. Além disso, o estabelecimento de latência no hospedeiro heterólogo e a possibilidade de reativação do BoHV-1 em cabras devem despertar preocupação em programas de erradicação.

6.3 Herpesvírus de suínos

6.3.1 Herpesvírus suíno tipo 1

(vírus da doença de Aujeszky)

A doença de Aujeszky – ou pseudorraiva – é causada pelo herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), também denominado vírus da doença de Aujeszky ou vírus da pseudorraiva (PRV). Embora a nomenclatura atual recomende o uso da primeira denominação, o vírus é mais conhecido como PRV. O SuHV-1 pertence ao gênero *Varicellovirus*, da subfamília *Alphaherpesvirinae*, e possui um genoma DNA de fita dupla, com, aproximadamente, 150 kb, que codifica mais de 70 proteínas.

Em regiões endêmicas, a doença de Aujeszky é considerada uma importante causa de perdas econômicas na suinocultura, relacionadas

com as altas taxas de morbidade e mortalidade de leitões, redução da performance dos reprodutores e redução do desenvolvimento dos animais em crescimento e terminação. Atualmente, grande parte da repercussão econômica da doença se deve a restrições ao comércio interestadual de reprodutores e internacional de reprodutores e produtos suínos. Em virtude dessas restrições, vários países já erradicaram a doença dos rebanhos comerciais e vários outros estão com programas de controle e erradicação em andamento.

6.3.1.1 Epidemiologia

Até a década de 1980, a infecção pelo SuHV-1 estava presente de forma endêmica em praticamente todos os países que possuíam expressão na suinocultura. A crescente repercussão econômica da doença, sobretudo devido às restrições ao comércio de animais e produtos, motivou vários países a empreender programas de controle e erradicação. Atualmente, a infecção é considerada erradicada em suídeos domésticos na França, Alemanha, Áustria, Suíça, Dinamarca, Reino Unido e nos Estados Unidos. Todavia, o SuHV-1 continua circulando nas populações de suídeos silvestres nos Estados Unidos, Alemanha, Polônia, França, Itália, dentre outros. Dessa forma, programas de vigilância epidemiológica devem continuar nas regiões de risco, pois as populações de suídeos silvestres podem atuar como reservatórios do vírus, o que dificulta a erradicação completa da doença.

No Brasil, a doença foi inicialmente diagnosticada em 1912, e, posteriormente, foi identificada em todos os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, além da Bahia e Ceará. Nos últimos anos, a infecção tem sido mais freqüentemente relatada em Santa Catarina (SC), o que fez com que fosse implementado um programa estadual de erradicação. O programa, financiado por um esforço de parcerias firmadas entre a indústria, associação de produtores e governo, tem obtido sucesso em, gradualmente, erradicar o PRV de rebanhos suínos do estado. Desde julho de 2004, a doença de Aujeszky não é identificada em SC. Em 2003, pela primeira vez, foram diagnosticados surtos da doença em suínos no Rio Grande

do Sul. Os focos foram prontamente identificados e a infecção foi erradicada.

Os suínos são os hospedeiros naturais do SuHV-1, mas o vírus pode ser transmitido e causar doença grave em hospedeiros secundários (ruminantes, felinos, caninos e roedores). Além dessas espécies, os coelhos são particularmente sensíveis à infecção experimental. Os hospedeiros secundários são geralmente terminais, e a excreção do vírus por estes animais é insignificante. Equinos e aves são muito pouco susceptíveis à infecção, e o homem é refratário. A infecção de carnívoros pode ocorrer pela ingestão de carnes contaminadas ou através de lesões na pele ou mucosas.

Os suínos que sobrevivem à infecção se tornam portadores subclínicos do vírus na sua forma latente. Estes animais se constituem nos reservatórios do vírus e podem transmitir a infecção a outros animais sempre que ocorrer reativação da infecção. A exemplo dos outros herpesvírus, a infecção latente se constitui no ponto-chave da epidemiologia do SuHV-1 e representa um obstáculo importante para o controle e erradicação da infecção de populações suínas.

Os índices de morbidade e mortalidade, associados com a infecção, dependem da idade dos animais infectados e são mais altos em animais jovens. Em leitões com 6 a 10 dias de idade, a morbidade pode atingir 95% e a mortalidade, 90%, enquanto entre animais com 21 a 35 dias, esses índices podem ser de 45 e 30%, respectivamente. Em animais adultos, a mortalidade é insignificante, e as perdas estão associadas principalmente com problemas reprodutivos. A freqüência de infecções respiratórias é variável e depende da cepa viral e de determinados fatores ambientais que influenciam a disseminação do vírus.

O vírus é transmitido por contato direto ou indireto de animais susceptíveis com secreções contaminadas ou animais infectados. Os animais excretam o vírus em secreções nasais e saliva por vários dias após serem infectados. O sêmen de machos contaminados e as secreções genitais e restos fetais de porcas que abortam também contêm o vírus e podem transmiti-lo. Urina, fezes e leite também possuem alguma importância como vias de excreção e eliminação. A infecção por

contato indireto pode ocorrer através da água, ração, restos de matadouro, caminhões de transporte, roupas ou contato com materiais contaminados.

Os animais latentemente infectados são considerados portadores, podem excretar o vírus periodicamente e são importantes na manutenção da doença na forma endêmica.

6.3.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

As conseqüências clínico-patológicas da infecção pelo SuHV-1 variam amplamente e dependem de fatores como idade e estado fisiológico dos animais, via de infecção, dose e virulência da cepa viral.

A via mais comum de infecção é a nasofaríngea, e os suínos adquirem a infecção por contato direto ou indireto com animais doentes ou portadores, em particular com a saliva e secreções nasais contaminadas. O contato direto focinho-focinho também parece desempenhar um papel relevante na transmissão. A transmissão por aerossóis a curtas distâncias também ocorre e pode se constituir em importante forma de disseminação do vírus em regiões de alta densidade populacional. Eventualmente o vírus pode infectar animais pela via digestiva, pelo coito ou pela inseminação artificial. Em granjas que apresentaram surtos ou a infecção endêmica, gatos e cães podem contrair a doença pela ingestão de restos fetais.

Os sítios de replicação primária são os epitélios do trato respiratório superior (nasal, etmoidal e faríngeo), tonsilas e pulmões. Após essa replicação inicial, o vírus pode atingir tecidos linfóides regionais e se disseminar sistemicamente. A viremia, no entanto, parece não desempenhar um papel importante na patogenia. A invasão do encéfalo parece ocorrer principalmente pela via nervosa olfatória, através da qual o vírus atinge os bulbos olfatórios e, posteriormente, dissemina-se pelo cérebro. Outra via de acesso ao SNC é o transporte ao longo das fibras que constituem os nervos glossofaríngeo e trigêmeo. A infecção do gânglio trigêmeo pode ser seguida de transporte subsequente até a ponte e restante do cérebro ou do estabelecimento de latência.

A replicação viral no SNC resulta em lesões progressivamente severas que levam a disfunções motoras e, eventualmente, à morte. Essas alterações são mais comuns em leitões com idade entre uma e duas semanas. Os sinais neurológicos são gradativamente menos frequentes e menos severos em animais com mais idade e raros em animais adultos, apesar da ocorrência da infecção neurológica. Nestes animais, a replicação viral no encéfalo parece apresentar um padrão localizado. Sinais neurológicos e morte são raros em animais de engorda. Animais de engorda e adultos frequentemente apresentam letargia e depressão durante episódios de infecção, o que pode ser atribuído ao envolvimento do SNC.

A infecção, com determinadas cepas e em altas doses, frequentemente resulta em infecção e doença pulmonar. Nos pulmões, o vírus replica focalmente em uma variedade de tipos celulares, incluindo os macrófagos alveolares, células epiteliais alveolares, células da musculatura lisa, endoteliais e leucócitos. Como mencionado, a infecção é tipicamente focal e não-disseminada. Assim, o SuHV-1 não é considerado um agente respiratório clássico, cuja infecção se dissemine pelos pulmões. A infecção dos macrófagos alveolares possui um significado especial, pois afeta a primeira linha de defesa dos pulmões contra agentes invasores. Por isso, a infecção viral é frequentemente acompanhada de infecção bacteriana secundária, que leva à pneumonia, abscedação e pleurite. A viremia que pode ocorrer nesses casos ou após infecção do trato respiratório superior é passageira e, provavelmente, de pouca importância na patogenia da infecção.

Após a infecção aguda, tanto subclínica, quanto com sinais inespecíficos, neurológicos ou respiratórios, os animais permanecem portadores da infecção latente. Durante a latência, o genoma viral permanece no gânglio nervoso responsável pela inervação da área onde ocorreu a infecção primária (usualmente no gânglio trigêmeo). Esses animais podem, periodicamente, excretar o vírus para o meio ambiente durante a reativação da infecção.

A infecção nos animais adultos é, frequentemente, subclínica. As maiores perdas causadas pela infecção se devem a um elevado índice de mortalidade e morbidade entre leitões (até 100%

em animais com menos de um mês), queda de produtividade das matrizes e redução no desenvolvimento dos animais em crescimento e terminação.

Em eventos de introdução do agente em rebanhos livres, a doença é caracterizada por alta mortalidade na maternidade, abortos e por uma porcentagem variável de animais apresentando sinais neurológicos e respiratórios na creche, recria, terminação e gestação. Essa fase inicial dura de uma a três semanas, com a redução progressiva da intensidade dos sinais clínicos. Após essa fase, os surtos se repetem com menor gravidade, a intervalos de tempo aproximadamente regulares. Nesses eventos, são afetados principalmente os leitões entre quatro dias e quatro semanas de idade, com o arrefecimento dos sinais dentro de uma a duas semanas.

Embora o vírus seja geneticamente pouco variável, podem ocorrer diferentes formas clínicas, relacionadas com o tropismo de diferentes amostras virais, que podem afetar primariamente os sistemas respiratório ou nervoso. Em leitões, os sinais clínicos mais observados são: hipertermia, inapetência, depressão, incoordenação, tremores musculares, decúbito lateral, convulsões e morte. Em animais mais velhos, observam-se hipertermia, anorexia e sinais respiratórios. Porcas em gestação manifestam retornos ao cio e a infecção pode resultar em mumificação, abortos, natimortos, malformações, nascimento de leitões fracos e infertilidade. Nesta categoria animal, os sinais clínicos neurológicos são raros, mas podem ocorrer.

Em bovinos, ovinos, cães e gatos, a infecção pelo SuHV-1 é fatal, mas não contagiosa. Nesses animais, ocorre um intenso prurido no local da infecção, se esta ocorrer através da pele, o que é seguido de sinais neurológicos progressivamente severos e morte.

Os achados de necropsia em suínos afetados, se presentes, são: congestão das meninges e aumento de volume do líquido céfalo-raquidiano, hemorragias, congestão ou focos necróticos nas amígdalas e laringe, rinite fibrinosa, edema pulmonar e consolidação dos lóbulos pulmonares anteriores (no caso das amostras pneumotrópicas do vírus). As lesões microscópicas observa-

das no pulmão são de pneumonia intersticial e necrose do epitélio bronquial. Observam-se, ainda, focos de necrose de 1 a 2 mm de diâmetro no fígado, nas adrenais, baço e miocárdio. Em casos neurológicos, ocorre meningoencefalite não supurativa, com ganglioneurite e mielite. Além disso, observam-se intensa infiltração perivascular, necrose neural, gliose e neuronofagia.

6.3.1.3 Diagnóstico

Em áreas endêmicas ou de risco, a ocorrência de doença neurológica em leitões jovens (uma a duas semanas), sinais respiratórios em várias faixas etárias e abortos devem suscitar uma investigação etiológica, na qual o SuHV-1 deve ser considerado como um potencial suspeito. Se a infecção é causada por uma amostra virulenta e cursa com sinais típicos, uma análise do curso clínico-patológico do evento, associada com os achados de necropsia, podem levar a um diagnóstico presuntivo relativamente seguro. No entanto, a confirmação etiológica é imprescindível também pelo caráter regulatório do qual se reveste a enfermidade.

O diagnóstico laboratorial é realizado pela identificação do vírus em tecidos e/ou em secreções de suínos doentes. O diagnóstico rápido é feito usualmente por testes de IFA direta em tonsilas, pulmão, traquéia, baço, rins, fígado e cérebro. O isolamento do vírus pode ser realizado a partir dessas amostras. O SuHV-1 replica em uma variedade de células de origem suína, sejam cultivos primários ou linhagens contínuas, nas quais produz um efeito citopático típico. O vírus pode também ser multiplicado em células de origem bovina, como células de cornetos nasais. Os isolados de campo podem ser adaptados a replicar em células de linhagem bovina, como as MDBK. Após o aparecimento do ECP – que é um indicativo forte da identidade do agente – o vírus pode ser identificado por IFA ou IPX nos cultivos inoculados. A neutralização viral com anti-soro específico é uma alternativa para a identificação do vírus. Em alguns laboratórios, são utilizados testes de PCR para a detecção do genoma viral em amostras suspeitas. Esta técnica possui aplicação especial para detectar infecções latentes.

Alternativamente, o diagnóstico de um episódio de doença aguda pode ser estabelecido por análise sorológica de soro pareado. Para isso, amostras de soro devem ser coletadas dos animais doentes durante o curso da doença e três a quatro semanas após. Um aumento de título de anticorpos igual ou superior a quatro vezes entre as coletas é indicativo de infecção recente. Com base nisso, testes sorológicos que permitam quantificar os anticorpos no soro (p. ex.: testes de SN ou ELISA) podem ser utilizados para a confirmação do agente responsável pelo episódio. Vários testes sorológicos podem ser utilizados, mas o teste de ELISA é mais sensível, rápido e econômico do que o teste de SN. Variações desse teste, quando usados em conjunto com vacinas diferenciais, permitem distinguir animais vacinados daqueles infectados naturalmente.

6.3.1.4 Controle e profilaxia

As estratégias de combate ao SuHV-1 variam de acordo com a situação epidemiológica da infecção nas áreas-alvo. Em todas as situações, o papel dos portadores latentes se reveste de importância fundamental e deve permear a planificação e adoção das medidas adequadas. Em geral, as estratégias de combate são baseadas em uma combinação de vacinação, identificação e descarte de soropositivos, além de medidas gerais de prevenção.

Em áreas livres que apresentam risco de introdução do agente, as medidas devem ter caráter essencialmente preventivo, para reduzir as chances de introdução do vírus. Controle de trânsito de animais, barreiras sanitárias, quarentena e certificação de origem e condição sorológica de animais e produtos introduzidos na área, além de vigilância epidemiológica sistemática, são geralmente efetivos na manutenção da condição sanitária de regiões com essas características.

Em regiões que apresentem focos esporádicos, o controle pode ser realizado por uma combinação entre identificação e descarte de animais positivos (e de rebanhos infectados) e vacinação, associado com medidas preventivas gerais. As granjas infectadas devem ter os animais abatidos,

seguido de desinfecção rigorosa e vazio sanitário. Rebanhos vizinhos – e potencialmente expostos ao agente – podem ser obrigados a adotar medidas semelhantes. Regiões com essas características apresentam condições favoráveis para adoção posterior de métodos de erradicação.

Em regiões endêmicas, o melhor método de controle da doença é a erradicação do vírus das criações. Todavia, a prevenção da doença clínica e da mortalidade pode ser feita através do uso de vacinas. Várias vacinas são utilizadas no controle das infecções pelo SuHV-1, incluindo vacinas tradicionais e vacinas diferenciais. Uma grande limitação das vacinas tradicionais contra o SuHV-1 é a indução de uma resposta humoral indistinguível da resposta induzida em resposta à infecção natural. Como virtualmente todos os animais infectados com alfa herpesvírus tornam-se latentemente infectados, os animais soropositivos são considerados portadores do vírus. As vacinas diferenciais são as mais utilizadas no mundo inteiro, por possibilitar, através de teste sorológico específico, a diferenciação de animais com anticorpos vacinais daqueles infectados com o vírus de campo. As vacinas diferenciais disponíveis incluem vacinas com vírus vivo atenuado, vírus inativado e subunidades virais.

A possibilidade de manipulação genética do vírus para a produção de vacinas diferenciais tem permitido um avanço notável na erradicação do PRV em vários países. Sendo assim, a maioria dos programas de erradicação de pseudorraiva no mundo utilizam vacinas com marcadores antigênicos que não contêm a glicoproteína gE combinada com testes diferenciais para a identificação dos animais infectados.

A vacina contra a pseudorraiva aprovada atualmente pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para uso no Brasil é uma vacina inativada deletada na glicoproteína E (também chamada GI). Dessa maneira, pode-se identificar e diferenciar animais infectados com amostras de campo dos animais vacinados, se submetidos ao teste de ELISA diferencial para a gE (ausente na vacina). Todavia, no Estado de Santa Catarina, onde existe um programa oficial de erradicação da doença de Aujeszky desde 2001, é permitido o

uso de uma vacina com vírus atenuado com deleção no gene da gE. Este uso é permitido apenas para suínos destinados ao abate.

Existem várias estratégias de erradicação da pseudorína, como a eliminação total do rebanho, teste e remoção com ou sem vacinação, ou vacinação por um determinado período de tempo antes da remoção. Os fatores que influenciam qual opção escolher basicamente são os seguintes: a prevalência de animais infectados no rebanho e na região, a necessidade financeira e estratégica de eliminar o problema o mais rápido possível (barreiras para exportação de carnes e reprodutores) e o custo do programa.

Devido à capacidade do SuHV-1 de estabelecer infecção latente sem a manifestação de sinais clínicos, os suínos infectados, mas aparentemente saudáveis, são considerados potenciais disseminadores do vírus. Assim, torna-se cada vez mais importante que os suinocultores exijam a certificação sanitária oficial, emitida pelo Ministério da Agricultura, dos rebanhos que fornecem reprodutores para a sua criação.

6.4 Herpesvírus de eqüinos

6.4.1 Herpesvírus eqüino tipo 1

O EHV-1 é membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e se constitui em um importante agente de aborto em éguas. Pelo fato de ser genética e antigenicamente relacionado com o herpesvírus eqüino tipo 4 (EHV-4, agente da rinopneumonite eqüina), estes dois vírus eram antigamente considerados subtipos 1 e 2 do EHV-1, respectivamente. Entretanto, diferenças genômicas importantes entre os dois subtipos virais, demonstradas pela análise por restrição enzimática, justificaram a sua reclassificação. Assim, em 1988, os subtipos 1 e 2 do EHV-1 foram considerados duas espécies de vírus: EHV-1 e EHV-4.

O EHV-1 possui um genoma de, aproximadamente, 145 a 150 kb e, de acordo com a organização genômica, enquadra-se no grupo D dos alfa herpesvírus. O genoma do EHV-1 contém 76 genes descritos até o presente.

6.4.1.1 Epidemiologia

A infecção pelo EHV-1 é enzoótica na maioria das populações eqüinas e uma parcela significativa dos animais de áreas endêmicas apresenta anticorpos contra o agente. Entretanto, a maioria dos testes sorológicos não é capaz de diferenciar anticorpos contra EHV-1 e EHV-4, devido à extensa reatividade cruzada entre os dois vírus. Assim, a prevalência da infecção pelo EHV-1, com base em testes sorológicos, somente poderá ser determinada com o uso de testes que diferenciem a resposta imunológica dirigida a esses dois vírus.

O EHV-1 é transmitido de forma horizontal, por contato direto e indireto entre animais suscetíveis e animais que estão excretando o vírus. O vírus é excretado durante a infecção aguda e durante episódios de reativação da infecção latente. Geralmente, a duração e magnitude de excreção viral são significativamente superiores durante a infecção aguda. No entanto, a excreção após a reativação é suficiente para permitir a transmissão do vírus. Por isso, animais latentemente infectados são importantes fontes de infecção e manutenção da infecção nos rebanhos. Os eqüinos são os únicos hospedeiros naturais conhecidos deste agente e animais de todas as idades podem ser afetados.

6.4.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Em éguas que abortam, o vírus é excretado junto com os fetos abortados, fluidos e restos placentários, os quais podem conter altos títulos de vírus. Os animais suscetíveis geralmente adquirem a infecção pelo contato da mucosa respiratória com esses materiais. Com isso, o vírus penetra e se multiplica inicialmente no epitélio da cavidade nasal, faringe, traquéia, brônquios e bronquíolos, infectando a seguir leucócitos e células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos. A infecção, então, dissemina-se para os linfonodos locais, a partir dos quais células mononucleares infectadas entram na circulação sanguínea, resultando em uma viremia associada a células. Em fêmeas prenhes, o vírus alcança o útero e atravessa

a barreira transplacentária, sendo transferido dos leucócitos infectados para o endotélio vascular. Como consequência, ocorre infecção de vasos e tecido uterino em algumas situações, e de tecidos fetais em outras. Assim, os abortos podem ser causados tanto pela infecção e patologias graves nos tecidos do feto, causando a sua morte e expulsão; como pela produção de vasculite, trombose, infartos dos cotilédones e dano isquêmico do endométrio, o que ocorre pela replicação do vírus em células do endotélio de vasos uterinos.

A infecção respiratória de éguas prenhes é freqüentemente assintomática ou acompanhada de sinais inespecíficos. Quando causa infecções sintomáticas, o que é pouco freqüente, o EHV-1 está associado com sinais respiratórios leves. As infecções respiratórias vêm acompanhadas de aumento do volume de linfonodos locais e descarga nasal serosa, que pode se tornar mucopurulenta como consequência de infecções secundárias bacterianas.

Os abortos podem ocorrer a partir do quarto mês de gestação, mas acontecem com maior freqüência a partir do sétimo mês. Às vezes, os abortos ocorrem na forma de surtos, também chamados de “tempestades de abortos”, quando mais de 50% dos potros podem ser perdidos. Os fetos geralmente são abortados espontaneamente, junto com a placenta, e estão sempre mortos, sendo que aqueles abortados antes dos seis meses de gestação estão geralmente autolisados. As fêmeas infectadas na gestação tardia podem parir potros vivos, mas que são freqüentemente anormais, apresentam fraqueza e dificuldade respiratória e, em geral, morrem dentro de poucos dias após o nascimento.

É importante observar que nem todas as amostras de EHV-1 apresentam o mesmo potencial abortigênico, e que fatores do hospedeiro, como o estágio da gestação, também influenciam no resultado da infecção. Assim, foi demonstrado que lesões no útero de éguas infectadas no final da gestação podem ser mais graves do que nas éguas infectadas no início da gestação.

A infecção perinatal nos neonatos resulta em uma doença fatal generalizada que cursa com dificuldade respiratória e esporadicamente encefalite.

Eventualmente o EHV-1 invade o cérebro dos animais infectados, provavelmente da mesma forma que atinge o útero. Ao chegar ao cérebro, o vírus replica no endotélio de vasos, em neurônios e astrócitos, podendo induzir encefalomielite. A doença neurológica devida ao EHV-1 é pouco freqüente e pode ou não estar associada com sinais respiratórios e/ou abortos. Animais de todas as idades são susceptíveis, mas éguas prenhes e potros em amamentação são particularmente afetados. O período de incubação nesses casos é de seis a 10 dias. Os sinais clínicos variam desde uma leve ataxia até o decúbito completo, com paralisia dos membros anteriores e posteriores. Animais que apresentam um curso leve geralmente se recuperam completamente.

Após a infecção primária, o EHV-1 estabelece infecção latente em tecidos linfóides, leucócitos periféricos e nos gânglios trigêmeos. Situações estressantes, como o desmame, castração e transporte, bem como o uso de corticosteróides podem induzir a reativação do vírus. Dessa forma, o vírus pode ser disseminado para o meio ambiente e contaminar animais susceptíveis ou pode causar infecções recorrentes, resultando em abortos ou casos de encefalomielite.

Recentemente foi descrita uma nova forma esporádica de infecção pelo EHV-1 em eqüinos jovens, na qual o principal alvo da infecção é o endotélio vascular dos pulmões. Nessa forma da infecção, a manifestação clínica predominante é dificuldade respiratória ou morte súbita.

Os achados patológicos da infecção pelo EHV-1 variam de acordo com os tecidos-alvo da replicação viral. Na infecção respiratória, os animais podem apresentar lesões herpéticas nas membranas mucosas de todos os segmentos do trato respiratório superior. No epitélio respiratório e centros germinativos dos linfonodos, observa-se necrose e presença de corpúsculos de inclusão.

Nas infecções de éguas gestantes, o EHV-1 se multiplica no endotélio dos vasos uterinos e causa lesões isquêmicas, vasculite, trombose, infartos dos cotilédones, levando ao aborto. Os abortos precoces são caracterizados pela autólise extensa do feto. Em abortos mais tardios, uma série de lesões macroscópicas pode ser observa-

da, como edema subcutâneo, edema pulmonar, esplenomegalia e necrose hepática. As lesões histopatológicas são caracterizadas por uma bronquiolite necrosante e hepatite. Na mortalidade perinatal, as principais lesões aparecem no aparelho respiratório, com pneumonia intersticial, atelectasia e edema pulmonar. São observadas também necrose tímica e depleção de linfócitos tímicos e esplênicos.

Na doença neurológica, observam-se pequenas hemorragias focais distribuídas nas meninges, parênquima cerebral e medula. As alterações histológicas no sistema nervoso central incluem vasculite, congestão, trombose e degeneração isquêmica.

A imunidade contra o EHV-1, após a infecção respiratória, é curta, durando aproximadamente três a quatro meses. A imunidade induzida após o aborto é mais duradoura, e a ocorrência repetida de abortos pela mesma fêmea é rara.

Os potros que mamam o colostro de éguas soropositivas podem apresentar diferentes níveis de anticorpos protetores. Entretanto, a presença de anticorpos circulantes pode não ser suficiente para induzir proteção contra a infecção, e a imunidade celular parece desempenhar um papel importante.

6.4.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo EHV-1 pode ser realizado pelo isolamento e identificação viral a partir de amostras clínicas. As amostras a serem coletadas e enviadas ao laboratório incluem o pulmão, baço, fígado e timo fetais. Suabes nasais, líquido céfalo-raquidiano, medula e sangue total também podem ser utilizados para o isolamento viral em caso de encefalomielite (Tabela 17.4). O EHV-1 é capaz de se multiplicar em cultivos celulares de outras espécies, além da equina, o que auxilia a diferenciá-lo do EHV-4, que só se multiplica em células de origem equina. Células RK-13 (rim de coelhos) e Vero (de primatas) são rotineiramente utilizadas para o isolamento e multiplicação do EHV-1 em laboratórios de virologia.

Em cultivos celulares, o EHV-1 produz ECP típico de herpesvírus: arredondamento celular,

formação de aglomerados semelhantes a cachos de uva, produção de focos de destruição celular e destruição total do tapete. A identificação do vírus pode ser feita pelo uso de anticorpos monoclonais em testes de IFA ou IPX. Essas técnicas têm sido também utilizadas para demonstrar a presença de antígenos virais em cortes de tecidos congelados. Como alternativa ao isolamento viral, técnicas moleculares, como a PCR, podem ser utilizadas em amostras clínicas.

A detecção de anticorpos no soro de animais com suspeita de infecção pelo EHV-1 pode ser realizada através das técnicas de SN, fixação de complemento e ELISA.

A presença de lesões teciduais características, como vasculite, pode ser sugestiva da infecção pelo EHV-1.

6.4.1.4 Controle e profilaxia

Em propriedades livres, o controle deve basear-se em medidas preventivas para impedir a introdução do vírus no rebanho. Além de monitoramento sorológico periódico dos animais, quaisquer animais anexados ao plantel devem ser testados previamente para evitar a introdução de portadores. Em propriedades que possuem animais soropositivos, além dessas medidas, deve-se tentar manter os animais soropositivos separados dos demais, evitar a introdução de animais sem o uso de quarentena (três semanas), separar as éguas em gestação e éguas com potros dos demais animais, e isolar do restante do rebanho as éguas que abortaram. Além disso, deve-se minimizar a presença de fatores estressantes, tais como desnutrição, superpopulação e transporte de fêmeas em estado avançado de gestação.

Vacinas inativadas e vivas atenuadas têm sido utilizadas na prevenção da infecção pelo EHV-1. Experimentos têm demonstrado que as vacinas inativadas induzem melhor proteção contra abortos do que as vacinas vivas atenuadas. As vacinas inativadas devem ser aplicadas aos 5, 7 e 9 meses de gestação. Revacinações anuais são recomendadas.

Tabela 17.4. Manifestações clínicas e material para diagnóstico nas herpesviroses de eqüinos

Vírus	Doença (condição)	Material para diagnóstico
Herpesvírus eqüino tipo 1 (EHV-1)	Abortos, infecção urogenital, doença respiratória.	Tecidos fetais, suabes genitais ou nasais, soro pareado.
Herpesvírus eqüino tipo 2 (EHV-2)	Conjuntivite, faringite	Suabes conjuntivais e faríngeos.
Herpesvírus eqüino tipo 3 (EHV-3)	Doença venérea em éguas e garanhões.	Suabes das lesões, soro pareado.
Herpesvírus eqüino tipo 4 (EHV-4)	Doença respiratória aguda em animais jovens, abortos.	Suabes faríngeos, tecidos fetais, soro pareado.

Fonte: adaptada de Evermann (1992).

6.4.2 Herpesvírus eqüino tipo 3

O exantema coital eqüino é causado pelo herpesvírus eqüino tipo 3 (EHV-3). Esse vírus também está classificado na subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e apresenta alguma similaridade antigênica com o EHV-1. Apesar dessas semelhanças antigênicas, não há evidências de reatividade sorológica cruzada deste vírus com o EHV-1 ou com o EHV-4 em testes de SN. O exantema coital é uma enfermidade aguda, geralmente leve, caracterizada pela formação de lesões vesiculares, pustulares e exsudativas na mucosa genital e perineal especialmente de fêmeas. Eventualmente os lábios e a mucosa nasal são também afetados.

6.4.2.1 Epidemiologia

O exantema coital eqüino apresenta ampla distribuição em populações de eqüinos, ocorrendo de forma endêmica na maioria dos países que possuem rebanhos numerosos. A transmissão do vírus ocorre principalmente por contato direto, durante o coito, e, possivelmente, o agente pode ser transmitido também por vetores mecânicos, como moscas contaminadas com secreções vaginais.

6.4.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

O período de incubação da doença varia de dois a cinco dias, período em que o vírus replica no epitélio da mucosa genital. A replicação leva à formação de vesículas, pápulas, pústulas e úlceras na mucosa genital externa. Na ausência de complicações, a cura total ocorre em até duas semanas, mas os animais permanecem portadores latentes do vírus.

A replicação viral na mucosa genital resulta na formação de vesículas, as quais evoluem para pústulas e úlceras que se localizam na vulva, vagina, pênis e prepúcio. As úlceras normalmente cicatrizam em 14 a 21 dias. Eventualmente, quando as lesões se formam sobre o epitélio pigmentado, manchas esbranquiçadas podem ser observadas nos locais em que as úlceras se desenvolveram. As lesões genitais primárias causadas pelo vírus podem ser contaminadas por bactérias, originando infecções secundárias que, se não complicadas, são resolvidas em até duas semanas. Embora lesões extensas possam ser observadas, a infecção se apresenta freqüentemente de forma subclínica ou leve e, muito raramente, ocorrem sinais clínicos sistêmicos como febre ou anorexia.

Apesar de ter sido demonstrado que inoculações experimentais intra-uterinas levam ao aborto, o EHV-3 geralmente não está associado com falhas reprodutivas em infecções naturais. Entretanto, as lesões na mucosa genital são doloridas, o que pode diminuir a libido e levar à recusa a monta pelos reprodutores.

A exemplo dos outros herpesvírus, todos os animais infectados com o EHV-3 se tornam portadores da infecção latente, carregando o vírus pelo restante da vida. A reativação viral pode ocorrer ocasionalmente, levando à excreção do vírus e possível infecção de outros animais.

6.4.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo EHV-3 pode ser realizado pelo uso de testes sorológicos (SN) pareados ou pelo isolamento e identificação do vírus a partir de secreções e raspados da mucosa afetada (ver Tabela 17.4). Suabes coletados de lesões genitais ou orais são submetidos ao isolamento viral em células de origem equina. Deve-se ressaltar que vários isolados do vírus são temperatura-sensíveis, dessa forma, os cultivos celulares inoculados com o material suspeito devem ser mantidos a 33-34°C. A identificação do vírus por IFA ou IPX deve ser realizada com cautela, pois o vírus compartilha alguns determinantes antigênicos com o EHV-1. Assim, a identificação definitiva pode ser obtida pela neutralização com soro hiperimune específico.

6.4.2.4 Controle e profilaxia

Em propriedades livres, medidas preventivas devem ser adotadas para impedir a introdução do agente. Dentre essas, recomenda-se o teste de reprodutores a serem introduzidos no rebanho. Como forma de manter a condição sanitária do rebanho, apenas animais soronegativos devem ser incorporados ao plantel. Na ocorrência de casos clínicos compatíveis com o EHV-3, o diagnóstico deve diferenciá-lo do EHV-1. Uma vez confirmada a etiologia, recomenda-se o isolamento e descanso sexual dos animais afetados.

Não existem vacinas disponíveis contra o EHV-3. Os animais afetados devem ser isolados, e os reprodutores devem ser removidos do serviço até que as lesões tenham desaparecido. Tratamento tópico para prevenir a ocorrência de infecções secundárias pode ser utilizado.

6.4.3 Herpesvírus equino tipo 4

A rinopneumonite equina é causada pelo herpesvírus equino tipo 4 (EHV-4), que também pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Como mencionado anteriormente, esse vírus apresenta uma estreita relação genética e antigênica com o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1, agente do aborto viral equino). O EHV-4 é um dos principais agentes virais associados com infecções respiratórias de equinos.

6.4.3.1 Epidemiologia

A infecção pelo EHV-4 apresenta-se disseminada nas populações de equinos, e uma grande parcela dos animais apresenta anticorpos contra o vírus. Cabe ressaltar, no entanto, que os anticorpos contra o EHV-4 não podem ser distinguidos daqueles direcionados contra o EHV-1 por testes sorológicos de rotina. Assim, não se pode saber, com certeza, qual a parcela dos animais soropositivos nestes testes foi exposta a cada um dos agentes. Ou seja, no total de animais soropositivos contra o herpesvírus equino, deve-se considerar que uma parcela pode ter sido infectada com cada um destes vírus, além de possíveis infecções mistas.

Durante a infecção respiratória aguda, o vírus é excretado em secreções nasais e expectorações e pode ser transmitido por contato direto ou indireto. A transmissão por aerossóis pode também ocorrer, mas depende da quantidade de vírus excretada, das condições climáticas (temperatura, umidade, ventos) e da distância entre os animais. A faixa etária mais frequentemente afetada pela infecção é de potros de dois meses a um ano de idade.

6.4.3.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a penetração pela via respiratória, o vírus se multiplica no epitélio nasal, faringe, traquéia e brônquios e, logo após, dissemina-se para os linfonodos regionais. Durante a infecção primária, os animais jovens podem desenvolver lesões erosivas características na mucosa respiratória. Em infecções agudas, corpúsculos de inclusão e necrose do epitélio respiratório e dos centros germinativos dos linfonodos regionais podem ser observados.

A infecção aguda é seguida do estabelecimento de infecção latente nos gânglios trigêmeos, e o vírus pode ser reativado periodicamente, geralmente em situações ligadas ao estresse. Assim, animais soropositivos são considerados carreadores e potenciais disseminadores do vírus.

Embora seja uma das infecções virais respiratórias mais comuns de eqüinos, a infecção geralmente é acompanhada de sinais leves a moderados. Os sinais clínicos mais frequentes são: febre, anorexia, aumento de volume dos linfonodos regionais, rinite e descarga nasal. A descarga nasal é abundante e, inicialmente, apresenta-se serosa, passando a mucopurulenta com a ocorrência de infecções bacterianas secundárias. Os sinais são observados após um período de incubação de, aproximadamente, dois a dez dias. Em infecções não complicadas, os sinais clínicos persistem por dois a sete dias. Eventualmente pode ocorrer broncopneumonia grave em animais mais jovens, o que pode resultar em alguma mortalidade. Esses casos estão associados com condições de superlotação, higiene inadequada e presença de infecções secundárias graves. Em casos raros, a infecção de fêmeas em gestação pelo EHV-4 pode resultar em abortos.

6.4.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico de infecções respiratórias em eqüinos deve necessariamente considerar o EHV-4 como um dos agentes suspeitos (ver Tabela 17.4). No entanto, a sintomatologia e o histórico

são apenas presuntivos, pois outros agentes podem estar envolvidos no quadro clínico. Assim, deve-se proceder a investigação etiológica com o auxílio de testes laboratoriais. Em geral, pode-se recorrer ao isolamento e identificação do vírus em amostras clínicas ou à sorologia pareada, com amostras coletadas durante a fase aguda e após a recuperação clínica. Para o isolamento, são recomendadas amostras de secreções nasais (coletadas com suabes) ou sangue total, dando-se preferência para as secreções. O isolamento deve ser realizado em células primárias ou de linhagem de origem eqüina. A diferenciação entre EHV-1 e EHV-4 pode ser obtida pela inoculação do material suspeito em células eqüinas (ED, derme eqüina) e RK-13 (rim de coelhos). O EHV-1 é capaz de replicar e produzir ECP em ambas as linhagens, enquanto o EHV-4 somente se multiplica nas células da espécie homóloga.

Os testes sorológicos de eleição são a SN e o ELISA. A SN pode ser realizada para verificar o aumento do título de anticorpos entre a fase aguda e a convalescença e, assim, confirmar a etiologia do evento clínico. Recentemente, um teste de ELISA foi desenvolvido para diferenciar entre anticorpos contra o EHV-1 e EHV-4.

6.4.3.4 Controle e profilaxia

As medidas de controle são basicamente as mesmas indicadas para os outros herpesvírus de eqüinos e envolvem uma mescla de medidas preventivas (para evitar a introdução do agente ou de animais infectados no rebanho) com medidas para reduzir as chances de transmissão entre animais do rebanho. Animais adquiridos e aqueles que participaram de exposições e/ou competições devem ser submetidos à quarentena no seu retorno para prevenir a introdução do agente.

Existem vacinas inativadas e atenuadas contra o EHV-4, algumas delas bivalentes (contendo também o EHV-1). As vacinas devem ser administradas inicialmente aos três ou quatro meses de idade, seguidas de reforços periódicos, especialmente durante a idade jovem, quando os animais são mais susceptíveis.

6.5 Herpesvírus de cães

6.5.1 Herpesvírus canino tipo 1

O herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) também é classificado na subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Apenas um sorotipo viral foi identificado até o presente, e a variação antigênica entre isolados de campo é pequena. O vírus replica *in vitro* somente em células primárias ou de linhagens de origem canina. Quando cultivado nessas células, o vírus produz ECP bem evidente e alguns isolados induzem a formação de sincícios.

6.5.1.1 Epidemiologia

A infecção pelo CaHV-1 está distribuída mundialmente em caninos domésticos e também em canídeos de vida selvagem. A doença causada pelo vírus ocorre principalmente em filhotes de até duas semanas de idade. Estudos de soroprevalência são limitados, mas demonstram que entre 30 a 100% dos cães domésticos apresentam anticorpos contra o CaHV-1, indicando a ampla distribuição do vírus entre os cães.

A transmissão do CaHV-1 ocorre pelo contato direto ou indireto dos neonatos com secreções oro-nasais e vaginais durante ou logo após o parto. A transmissão pelo coito, assim como infecções intra-uterinas, também podem ocorrer.

Após a resolução da infecção primária, ocorre o estabelecimento de infecções latentes, que persistem por toda a vida do animal. Os animais latentemente infectados podem periodicamente excretar vírus no ambiente durante os episódios de reativação. Nessas ocasiões, o vírus pode ser transmitido para animais susceptíveis.

6.5.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

O vírus excretado pelas fêmeas durante ou logo após o parto contamina os neonatos, nos quais o vírus replica na mucosa nasal, tonsilas e faringe. Nestes animais, pode ocorrer viremia associada a células (monócitos), seguida de replicação viral em órgãos como o fígado, rins, tecidos linfáticos, pulmões e sistema nervoso central. A

infecção é fatal quando o vírus infecta neonatos que não receberam imunidade passiva das mães. Nesses casos, a morte ocorre com maior frequência em animais com idade de uma e quatro semanas. Geralmente a fêmea infecta a sua ninhada somente uma vez, quando, provavelmente, não transfere imunidade humoral suficiente para os seus filhotes.

A infecção de animais de mais de duas semanas de idade raramente é fatal e resulta no desenvolvimento de infecções leves ou inaparentes.

O período de incubação da doença é de 6 a 10 dias, e a duração do período clínico pode ser bastante curta (um a três dias em neonatos sem imunidade). Os sinais clínicos observados são: anorexia, dispnéia, dor à palpação abdominal, incoordenação motora e diarreia. Pode haver descarga nasal hemorrágica e petéquias nas mucosas. Em geral, não se observa elevação de temperatura. A mortalidade da ninhada pode ser de 100%, dependendo da idade em que ocorreu a infecção e da presença anticorpos maternos.

O vírus pode ainda atravessar a barreira transplacentária e infectar os fetos durante a gestação, causando abortos ou o nascimento de filhotes fracos e com dificuldade no desenvolvimento.

O CaHV-1 pode também causar distúrbios respiratórios em animais adultos, principalmente quando associado com outros agentes infecciosos, como a *Bordetella bronchiseptica*, vírus da cinomose (CDV), e vírus da parainfluenza canina (cPI-2v).

Em animais adultos, a infecção pode ainda causar infertilidade. As lesões observadas em fêmeas maduras estão caracterizadas principalmente por lesões vesiculares e hemorragias vaginais, que são observadas principalmente durante o proestro. Os mesmos tipos de lesões podem ser observados na mucosa genital masculina.

Nos neonatos doentes, as lesões observadas na necropsia afetam principalmente os rins, os quais se apresentam hemorrágicos e necróticos. Corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser observados em áreas necróticas. Além dos rins, este tipo de lesão pode ocorrer nos pulmões, fígado, baço e intestino. Pode ocorrer aumento de volume de linfonodos, e necrose de placenta é frequentemente observada em fêmeas prenhes infectadas.

Os cães infectados permanecem latentemente infectados. A infecção latente se localiza nos gânglios trigêmeos ou lombo-sacrais. A reativação viral nas infecções latentes pode ser induzida por situações estressantes, como treinamento, transporte, introdução de novos cães na propriedade ou pelo uso experimental de medicamentos imunodepressores como os glicocorticóides.

6.5.1.3 Diagnóstico

A presença de lesões características, como petéquias, na superfície dos rins e edema pulmonar, juntamente com a observação de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, são indicativos da infecção pelo CaHV-1.

O diagnóstico definitivo da infecção é feito pela demonstração de antígenos virais em cortes de tecido através da técnica de IFA ou pelo isolamento viral. O isolamento pode ser realizado em células de origem canina, a partir de amostras de tecidos como pulmões e rins de animais afetados.

6.5.1.4 Controle e profilaxia

Medidas para reduzir o estresse e minimizar o contato de fêmeas prenhes com outros animais são indicadas para a prevenção da ocorrência da doença. Os filhotes recém-nascidos devem ser mantidos em locais abrigados e sob temperatura adequada, evitando-se a exposição a baixas temperaturas.

Uma vacina de subunidades está disponível na Europa desde 2003. A vacina é especialmente indicada para fêmeas durante a gestação e consiste de glicoproteínas virais purificadas associadas com adjuvante oleoso. Essa vacina demonstrou conferir boa proteção aos neonatos quando as mães são vacinadas duas vezes durante a gestação. As cadelas devem ser vacinadas durante o cio ou em fases iniciais da gestação e revacinadas uma a duas semanas antes do parto.

Uma vacina atenuada, *cold adapted* (vírus que replica sob temperaturas abaixo da temperatura corporal), foi recentemente desenvolvida, mas ainda não está disponível no comércio. Outras abordagens vacinais, como a utilização de

poxvírus aviários como vetores, têm sido testadas, porém sem resultados promissores.

6.6 Herpesvírus de felinos

6.6.1 Herpesvírus felino tipo 1

O herpesvírus felino (FeHV-1) é um alfa herpesvírus que infecta o trato respiratório superior de gatos domésticos, produzindo uma doença conhecida como rinotraqueíte viral felina (FVR). As doenças do trato respiratório dos felinos são frequentes em abrigos e gatis, e seguem ocorrendo mesmo com o uso disseminado de vacinas contra os principais agentes envolvidos: o FeHV-1, o calicivírus felino (FCV) e bactérias como a *Chlamydomydia felis* e a *Bordetella bronchiseptica*. Alguns estudos demonstram que 80 a 90% dos casos de doença do trato respiratório superior dos felinos são causados pelo FeHV-1 e/ou pelo FCV.

6.6.1.1 Epidemiologia

A infecção pelo FHV-1 é distribuída mundialmente. Anticorpos contra o agente podem ser detectados em mais de 70% dos gatos de criações ou abrigos. Nos gatos domésticos criados com pouco contato com outros animais, a prevalência é de aproximadamente 50%. No Brasil, a ocorrência da infecção e doença tem sido relatada em várias regiões. Sorologia positiva também já foi demonstrada entre felinos selvagens criados em cativeiro, que também são susceptíveis ao vírus.

A transmissão do agente ocorre principalmente pelo contato direto ou indireto com descargas nasais. O vírus pode ser transmitido também por aerossóis e, com menor frequência, por fômites contaminados. A mortalidade é maior entre filhotes com menos de seis meses de idade. Gatos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem a infecção latente e a reativação da infecção, permitindo a transmissão do vírus a outros animais. Os gatos portadores da infecção latente são os reservatórios do FeHV-1 e constituem a principal fonte de disseminação do agente nos gatis e abrigos de animais.

6.6.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a penetração pela via nasal, o vírus replica nas células epiteliais do trato respiratório superior e atinge a conjuntiva ocular. Aparentemente não ocorre viremia e a infecção parece ser restrita ao trato respiratório superior. O período de incubação é de 24 a 48 horas, e os sinais clínicos podem ser mais facilmente observados após três a cinco dias da infecção, permanecendo por duas a três semanas. Inicialmente observa-se descarga nasal serosa, que pode progredir para mucopurulenta pela colonização bacteriana da mucosa. Outros sinais clínicos incluem descarga ocular, conjuntivite, ceratite, ulceração da córnea, hiper-salivação, úlceras orais, desidratação, tosse, dispnéia e anorexia. Infecções bacterianas secundárias podem produzir broncopneumonia e septicemia, principalmente em filhotes, podendo resultar na morte. Fêmeas prenhes podem, ocasionalmente, abortar devido à toxemia e hipertermia.

As lesões macroscópicas incluem necrose dos epitélios nasal, faríngeo, da epiglote, laringe, traquéia e tonsilas. Broncopneumonia, pneumonite intersticial, necrose focal, acúmulo de células inflamatórias e exsudato fibrinoso nos alvéolos também podem ser observados. Microscopicamente, podem ser observadas inclusões intranucleares nas células epiteliais.

6.6.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo pode ser estabelecido pelo histórico e pelos sinais clínicos. No entanto, deve-se buscar confirmação laboratorial, pois outros agentes causam doença respiratória em felinos.

O isolamento do vírus pode ser realizado pela inoculação de secreções nasais, conjuntivais e faríngeas ou, ainda, de macerados de mucosa faríngea, ocular ou nasal, em células de linhagem ou primárias de origem felina. O FeHV-1 produz efeito citopático característico dos herpesvírus, com arredondamento e desprendimento celular do tapete, formação de aglomerados de células

semelhantes a cachos de uva, focos de destruição e, finalmente, destruição do tapete celular. O calicivírus felino (FCV) também produz efeito citopático em cultivos celulares e, por estar frequentemente associado com doença respiratória, deve ser distinguido do FeHV. Para isso, podem-se utilizar anticorpos específicos para um dos agentes nas técnicas de IFA ou IPX, ou realizar-se neutralização viral com anti-soro específico.

A detecção de antígenos virais em tecidos por IFA e a detecção de anticorpos por sorologia pareada também podem ser úteis no diagnóstico laboratorial.

6.6.1.4 Controle e profilaxia

A FVR é um problema sanitário importante em abrigos, gatis e casas com criação múltipla de gatos, onde o controle nem sempre é obtido somente com a utilização de vacinas. Algumas medidas recomendadas incluem o tratamento individual de animais infectados, a implementação de um protocolo de vacinação maciça e o isolamento de ninhadas de filhotes susceptíveis. Drogas antivirais utilizadas contra o vírus do herpes simplex humano (HSV), como o Aciclovir®, não são efetivas contra o FeHV-1. Portanto, o tratamento da FVR é somente de suporte.

Vacinas inativadas e uma vacina atenuada bivalente contra o FeHV-1 e o FCV estão disponíveis comercialmente. Essas vacinas induzem uma resposta imunológica que não impede a infecção, porém reduz a severidade da doença. Recomenda-se a primovacinação de filhotes com nove semanas de idade e uma segunda aplicação três a quatro semanas após. Reforços a cada três anos são recomendados. As vacinas podem ser aplicadas pela via parenteral ou intranasal. A via intranasal apresenta vantagens como a estimulação rápida de proteção, ausência de interferência da imunidade passiva e estímulo de imunidade local (IgA) no principal sítio de infecção.

Uma vacina experimental, contendo um mutante deletado do FeHV-1, no qual se inseriu o gene da proteína de capsídeo do FCV, está em fase de desenvolvimento e testes.

6.7 Herpesvírus de aves

6.7.1 Vírus da doença de Marek

A doença de Marek (MD) é uma doença linfoproliferativa altamente infecciosa que afeta galinhas. As primeiras observações relacionadas com esta enfermidade foram feitas pelo médico veterinário József Marek, em 1907, e relataram o desenvolvimento de polineurite e paralisia, resultantes de infiltração linfóide em nervos periféricos. Posteriormente observou-se que a polineurite e os linfomas viscerais, ocasionalmente observados nas aves, também estavam associados com a mesma doença. O agente etiológico dessa enfermidade foi identificado nos anos 1960.

O agente da MD (*Marek's disease virus*, MDV), é um membro da subfamília *Alphaherpesvirinae* e pertence ao gênero *Mardivirus*. O vírus foi inicialmente classificado como um *Gammapherpesvirus* pela sua habilidade de produzir tumores linfóides em galinhas. Posteriormente foi reclassificado como um *Alphaherpesvirus* com base em sua estrutura, genoma e rápida replicação em cultivo celular. Três sorotipos do MDV são conhecidos com base em análise de precipitação em gel de ágar, SN e PCR. Os vírus do sorotipo 1 (MDV-1) incluem os MDVs oncogênicos e seus variantes atenuados em cultivo celular, entre estes algumas cepas vacinais. Dentro do sorotipo 2 (MDV-2), encontram-se os vírus não-oncogênicos, que ocorrem naturalmente em galinhas; e, no sorotipo 3, são agrupados os vírus não-oncogênicos de perus (*turkey herpesviruses*, HVT).

As amostras de campo do MDV-1 são agrupadas em quatro patótipos com base na sua capacidade de causar tumores em aves. As amostras do MDV-1 podem ser consideradas como: a) cepas baixa patogenicidade (*mild*, mMDV), b) cepas de baixa virulência (*virulent*, vMDV), c) cepas de alta virulência (*very virulent*, vvMDV) e d) cepas de altíssima virulência (*very virulent plus*, vv+MDV).

6.7.1.1 Epidemiologia

A produção de aves atualmente é desenvolvida de forma bastante intensiva, o que favorece a rápida disseminação de agentes infecciosos em uma criação. A MD é altamente contagiosa, e a infecção ocorre por inalação de poeira contaminada com o vírus presente nos criatórios. O MDV pode persistir por longos períodos no meio ambiente e é tão ubíquo que, virtualmente, todas as aves domésticas do mundo acabam entrando em contato com o agente em alguma fase de suas vidas. A infecção nem sempre induz manifestações clínicas, o que dificulta a determinação da prevalência e incidência da infecção. A enfermidade ocorre comumente em galinhas, mas também têm sido descrita em perus, codornas e faisões.

A partir dos anos 1960, a despeito do uso de vacinas, surtos de MD, causados por amostras cada vez mais virulentas, vêm ocorrendo no mundo todo. No Brasil, os frangos criados industrialmente recebem uma vacina contra MD com a cepa HVT no primeiro dia de vida. As aves de ciclo longo, como poedeiras, matrizes e avós, recebem uma combinação de vacinas dos sorotipos 1 (CVI 988/Rispens) e 3 (HVT). A vacinação reduz, mas não impede a infecção nem a excreção viral, o que favorece a seleção de cepas mutantes e, conseqüentemente, problemas para o controle desta enfermidade. O MDV continua sendo um importante patógeno na produção avícola e tem sido intensivamente estudado por pesquisadores no mundo, porém pouco estudado no Brasil.

6.7.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A patogenia da MD é complexa e ainda não totalmente compreendida. A primeira fase da infecção inicia com a inalação do vírus pelo hospedeiro. Inicialmente, o vírus replica nas células epiteliais do trato respiratório e, subseqüentemente, infecta macrófagos locais e/ou células dendríticas. A partir dos pulmões, o vírus é transportado sistemicamente para o baço, timo,

e bursa de *Fabricsius* (BF), onde pode ser detectado já 24 horas pós-infecção (pi). A partir desses órgãos, o vírus infecta os linfócitos B e T e atinge um pico de replicação entre os dias 3 e 7 pi. Essas infecções são citolíticas e causam atrofia da BF e timo, resultando em grave imunossupressão.

Após a fase citolítica inicial, a infecção passa à fase latente em linfócitos T a partir dos dias 6 e 8 pi. Durante esse período, o vírus pode ser transportado por linfócitos até a pele, onde uma infecção produtiva ocorre nos folículos das penas. O MDV é um vírus estritamente associado com células, e partículas virais livres somente são produzidas pela replicação nos folículos das penas. A partir dessa replicação, o agente é excretado para o ambiente, geralmente entre os dias 10 e 14 pi.

A terceira fase da infecção consiste em uma infecção citolítica secundária que envolve também o sistema nervoso. Nessa fase, lesões inflamatórias importantes podem ser detectadas no cérebro e nos nervos de galinhas adultas, por volta dos dias 9 a 15 pi. Uma quarta fase da infecção é caracterizada pelo desenvolvimento de linfomas malignos de linfócitos T que se formam a partir do dia 12. Essa divisão da patogenia em quatro fases pode não ser tão clara quando há infecção pelas amostras vv+ e quando a latência não é estabelecida.

Linfócitos T, transformados pelo vírus e linhagens celulares derivadas de linfomas primários, mantêm os genomas virais integrados ao DNA celular, um aspecto único entre os herpesvírus. Nas infecções latentes com os demais herpesvírus, o genoma latente permanece em uma forma episomal no núcleo das células hospedeiras. O genoma do MDV contém vários oncogenes, destacando-se o que codifica a proteína *Meq*, membro da família de oncogenes *Jun/Fos*. A composição genética do hospedeiro influi decisivamente no resultado e gravidade da infecção pelo MDV. Proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) são fortemente associadas à resistência ou susceptibilidade genética ao vírus.

A polineurite crônica, paralisia transitória e os linfomas viscerais, observados inicialmente como sinais e lesões característicos da MD, estão aos poucos ocorrendo com menor frequência. As-

sim, os sinais clínicos muito graves causados pela forma aguda, relacionada com amostras vv+ têm sido cada vez mais comuns. Nos últimos 20 anos, os sinais neurológicos são dominantes e aparecem na forma de paralisia transitória na maioria das linhagens de galinhas. As amostras virais vv+ podem causar uma morbidade de mais de 90% e mortalidade devido a danos cerebrais graves. Nesses casos, a polineurite periférica e os linfomas podem estar ausentes.

As lesões observadas na doença resultam, em grande parte, da infiltração e proliferação dos linfócitos T em tecidos, podendo estar associadas com leucemia, e também são consequências da resposta inflamatória e lise de células não-linfóides pela replicação viral.

As lesões encontradas em vísceras e gônadas correspondem a áreas de lesões linfomatosas, em geral pequenas e difusas, e ocorrem especialmente em aves que desenvolvem a forma aguda da infecção. Esses órgãos se apresentam com volume aumentado e coloração acinzentada difusa. As lesões linfomatosas não são facilmente distinguíveis das lesões induzidas pelo vírus da leucose aviária. Lesões oculares relacionadas com infiltração linfocitária também podem ocorrer, de forma que há opacidade de córnea. Pele, músculo e pró-ventrículo podem ser também afetados pelos linfomas. A Tabela 17.5 apresenta as semelhanças e diferenças epidemiológicas e clínico-patológicas entre a MD e a leucose aviária.

6.7.1.3 Diagnóstico

A disponibilidade de AcMs que reagem somente contra o MDV (e não contra o HVT) é um pré-requisito para a identificação de tecidos ou células infectadas com este vírus. Esses AcMs podem ser utilizados em técnicas de IFA ou IPX. Em tecidos infectados com o MDV, independente da linhagem da ave ou virulência da amostra, quantidades detectáveis de antígenos virais podem ser identificadas na BF, timo ou baço, a partir do dia 3 pi. Os mesmos testes podem ser utilizados para identificar antígenos do MDV em cultivos celulares inoculados com material suspeito, quando o ECP é visível.

Tabela 17.5. Principais diferenças clínicas e patológicas entre a doença de Marek e a leucose aviária.

Característica	Doença de Marek	Leucose aviária
Idade afetada	2 - 7 meses	4 - 10 meses (+ de 16 semanas)
Paralisias	Comuns	Ausentes
Lesões macroscópicas		
Fígado	Comum	Comum
Nervos	Comum	Ausente
Pele	Comum	Raro
Bursa (tumores)	Raro	Comum
Bursa (atrofia)	Comum	Raro
Intestinos	Raro	Comum
Coração	Comum	Raro
Lesões microscópicas		
Células pleomórficas	Sim	Não
Céls. blásticas		
uniformes	Não	Sim
Infiltrado na íris	Sim	Não
Tumor na bursa	Interfolicular	Intrafolicular

Como o MDV é estritamente associado a células, e partículas virais livres são produzidas somente nos folículos das penas a partir do dia 12 pi, o isolamento viral nas fases mais iniciais da infecção envolve a passagem cuidadosa de células intactas em células de rim de galinha (CKC) ou de fibroblastos de embrião de galinhas (CEF). O vírus também pode ser isolado da capa flogística ou de macerados de baço pela inoculação em co-cultivos celulares ou de ovos embrionados. A inoculação pode ser feita na membrana cório-alantóide ou no saco da gema, e os embriões devem ter aproximadamente quatro dias. A presença do vírus pode ser demonstrada pela detecção de antígenos por IFA.

Um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos antivirais, desenvolvido nos anos de 1980, foi mais sensível do que testes de IFI utilizados anteriormente. Este tipo de ELISA pode ainda ser útil também para avaliar a resposta humoral de animais vacinados. A infecção com as amostras mais virulentas induz uma resposta de anticorpos pobre e temporária, o que, provavelmente, ocorre em consequência da lise de linfócitos B que se desenvolve durante a infecção.

O diagnóstico da MD também pode ser realizado pela técnica de PCR, utilizando DNA extraído de linfócitos. Amostras clínicas podem ser

positivas a partir do primeiro dia pós-infecção. Em estágios mais avançados da enfermidade, quando os folículos das penas estão produzindo partículas virais, as pontas das penas se constituem em uma fonte adequada para extração de DNA viral.

A amplificação de seqüências do MDV por PCR é um método direto de detecção e é tão sensível quanto o isolamento em co-cultivo de capa flogística em CEFs. Entretanto, PCR é extremamente simples de executar, e os resultados podem ser obtidos em poucas horas. Ao contrário do isolamento, que depende da presença de vírus viáveis, as amostras para a análise do PCR não precisam ser congeladas ou protegidas de inativação. Finalmente, a técnica de PCR representa o único teste rápido e sensível para detectar a presença de MDV atenuado e patogênico nas mesmas amostras.

6.7.1.4 Controle e profilaxia

Após a identificação do MDV como o agente etiológico da MD, os vírus MDV-2 e HVT (que não causam doença em galinhas) começaram a ser utilizados em vacinas vivas heterólogas contra a MD. A partir de então, a incidência da MD reduziu-se em 99% e este foi o primeiro exemplo de uma vacina eficaz contra um vírus que induz

tumores. Entretanto, com o surgimento de amostras mais virulentas do MDV, tornou-se comum o uso combinado de vacinas mistas contendo o MDV-2 e HVT. Quando algumas amostras ainda mais virulentas surgiram, a primeira amostra apatogênica de MDV (CVI 988-Rispens) começou a ser utilizada em uma vacina viva modificada. Atualmente esta amostra vem sendo amplamente utilizada na confecção de vacinas contra a MD.

Uma das principais restrições das vacinas disponíveis contra a MD é a sua incapacidade de induzir imunidade esterilizante. Conseqüentemente galinhas previamente vacinadas podem ser infectadas e disseminar o vírus de campo a outros animais. Esta é provavelmente a fonte de amostras de MDV virulento que circula entre populações de galinhas e pode contribuir para o surgimento de amostras cada vez mais virulentas.

Partículas virais do MDV podem se manter viáveis por longos períodos na poeira dos galpões, mas são sensíveis ao tratamento com detergentes, etanol e isopropanol a 70%. O uso de práticas de higiene do ambiente e das pessoas que têm acesso às aves pode também limitar a introdução e disseminação do agente nos criatórios. Além disso, o uso de quarentena e teste de aves de reposição podem também diminuir a pressão de infecção e prevenir a ocorrência de novos surtos.

6.7.2 Vírus da laringotraqueíte infecciosa

A laringotraqueíte infecciosa das aves (LT) é uma doença respiratória aguda que afeta galinhas, faisões e perus. O agente etiológico da LT é o herpesvírus de galídeos tipo 1 (GaHV-1, chamado também de ILTV), pertencente à subfamília *Alphaherpesvirinae*. A infecção pelo ILTV foi descrita, pela primeira vez, em 1926, nos Estados Unidos. A partir de então, a doença foi identificada em vários países onde existem criações comerciais importantes de aves. A LT é uma infecção de importância econômica que pode causar grandes prejuízos econômicos, principalmente em criações de galinhas.

6.7.2.1 Epidemiologia

Os principais hospedeiros naturais do ILTV são as galinhas, embora a doença já tenha sido observada também em faisões e perus. Aves de todas as idades podem ser infectadas, mas os sinais clínicos mais característicos são observados em aves adultas.

O ILTV apresenta uma distribuição mundial, tendo sido identificado em todos os países que têm avicultura comercial desenvolvida. No Rio Grande do Sul, o primeiro surto de LT em galinhas foi descrito em 1974. O primeiro surto da doença em perus, no Brasil, foi relatado em 2004.

O vírus é transmitido de forma horizontal, e a transmissão ocorre quando as aves infectadas excretam o vírus pelas vias ocular e respiratória. Aerossóis e secreções contaminadas entram em contato direto ou indireto com aves susceptíveis, possibilitando a infecção de novos hospedeiros e a disseminação do vírus no lote.

6.7.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

O período de incubação é de seis a doze dias, e o resultado da infecção primária depende do grau de patogenicidade da amostra viral, da idade e do estado imunológico das aves. Durante a fase aguda da infecção, as aves infectadas excretam o vírus principalmente pelas secreções respiratórias. Após penetrar pelas vias aéreas, o vírus replica inicialmente no epitélio respiratório. A partir daí, penetra em terminações nervosas e é transportado por via nervosa aos gânglios trigêmeos, onde estabelece infecção latente. Aparentemente a infecção latente pode se estabelecer também no epitélio respiratório e, até o momento, não foi descrita a ocorrência de viremia durante a infecção pelo ILTV. Reativações esporádicas do vírus latente causam infecções inaparentes, mas produtivas, resultando em disseminação do vírus a aves susceptíveis.

Os efeitos da infecção nos lotes de aves variam de acordo com a amostra envolvida no surto. Amostras de alta virulência provocam uma

forma bastante grave da infecção, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Por outro lado, amostras de baixa virulência podem causar uma forma subclínica da infecção. Nos surtos mais agudos, a morbidade pode atingir de 90 a 100%, e a mortalidade pode chegar a 70%. Nestes casos, as aves podem morrer em até dois a três dias pós-infecção. Mais frequentemente, a mortalidade é muito baixa (até 2%).

A infecção afeta principalmente a traquéia e laringe e é caracterizada por tosse e dispnéia. Em casos hiperagudos (raros), a tosse pode não ser observada, ocorrendo somente dispnéia, cianose e morte súbita. Os sinais clínicos mais observados na fase aguda são: descarga nasal e traqueal e tosse. Pode ser observado ainda: conjuntivite, edema periorbital e ceratite; e as aves podem eliminar uma secreção traqueal mucosa e hemorrágica. As aves tendem a se recuperar em 7 a 10 dias pós-infecção.

As lesões associadas com infecção pelo ILTV se localizam predominantemente nas vias aéreas superiores. Frequentemente observa-se congestão acentuada da mucosa da laringe e traquéia, que, em fases mais avançadas, podem se apresentar hemorrágicas e com exsudato caseoso. Corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser observados nas células epiteliais da traquéia. A infecção com amostras menos virulentas pode resultar em lesões bem mais leves, em que apenas um edema facial, sinusite e conjuntivite são observados.

A infecção pelo ILTV induz a produção de anticorpos neutralizantes, mas os títulos de anticorpos não apresentam correlação direta com proteção. Dessa forma, mesmo animais soropositivos ao ILTV são susceptíveis à doença e podem desenvolver sinais clínicos quando infectados com o vírus de campo. Além disso, foi demonstrado que aves bursectomizadas não produzem anticorpos anti-ILTV, mas podem ficar protegidas contra uma reinfeção, indicando a importância da imunidade celular.

6.7.2.3 Diagnóstico

O ILTV pode ser isolado a partir de amostras clínicas (traquéia e pulmões) inoculadas na

membrana corioalantóide de ovos com embriões de 9 a 11 dias de idade. Por volta do quarto dia pós-inoculação, observa-se o espessamento da membrana corioalantóide e a formação de placas necróticas. O vírus também pode ser isolado pela inoculação dessas amostras em células primárias de rim ou de fígado de pintos. O ECP observado inclui a formação de sincícios, corpúsculos de inclusão intranucleares e lise das células infectadas. A identificação do vírus a partir de amostras clínicas ou do agente recentemente isolado pode ser realizada pelas técnicas de IFA, PCR ou ME.

A detecção de anticorpos pode ser realizada pelas técnicas de IFI, SN, ELISA ou IDGA. Animais sorologicamente positivos, que não foram vacinados, são considerados portadores latentes e podem disseminar o vírus para animais susceptíveis.

6.7.2.4 Controle e profilaxia

O controle da infecção pelo ILTV é realizado pelo emprego de várias medidas que visam evitar o contato das aves com o agente. Assim, galinhas de diferentes idades e origens não devem ser misturadas no mesmo lote; deve-se fazer uso de medidas de higiene e desinfecção adequadas dos galpões; controle de animais que entram em contato com as aves – como roedores – além do uso sistemático de vacinação.

Vacinas vivas modificadas têm sido utilizadas na prevenção da infecção durante décadas em vários países. As amostras vacinais são atenuadas pela passagem em ovos embrionados ou cultivos celulares e podem ser aplicadas na água de bebida ou por aerossóis. Muitas dessas vacinas são eficazes, mas podem apresentar virulência residual, que pode aumentar à medida que o vírus vacinal circula na população vacinada. Sendo assim, vários surtos de LT têm sido atribuídos a amostras vacinais que recuperaram a virulência e começaram a causar infecções graves em aves susceptíveis.

7 Bibliografia consultada

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently

- infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.36-40, 1982.
- ALEXANDER, H.S.; NAGY, E. Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. **Avian Diseases**, v.41, p.646-693, 1997.
- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da mamilitarite herpética no Brasil. **Revista de Microbiologia**, v.8, p.9-15, 1977.
- ALLEN, G.P. et al. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. In: WERNERY, U. et al (eds). **Equine infectious diseases**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE, 8. Dubai, United Arab Emirates: R&W Publications, Newmarket, 1999. p.129-146.
- ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. Molecular epizootiology pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. **Progress in Veterinary Microbiology and Immunology**, v.2, p.78-144, 1986.
- ARDANS, A.A. Herpesviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology**. Massachusetts: Blackwell Science, 1999. Cap.63, p.350-365.
- BAATEN, B.J.; BUTTER, C.; DAVISON, T.F. Study of host-pathogen interactions to identify sustainable vaccine strategies to Marek's disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.100, p.165-177, 2004.
- BAGUST, T.J.; GUY, J.S. 1997. Laryngotracheitis. In: CALNEK, B.W. et al. (eds). **Diseases of poultry**. 10.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1997. p.527-539.
- BAIGENT, S.J. et al. Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p.78-86, 2006.
- BAIGENT, S.J.; DAVISON, T.F. Marek's disease virus: biology and life cycle. In: DAVISON, F.; NAIR, V. (Eds). **Marek's disease, an evolving problem**. Oxford: Elsevier, 2004. p.62-77.
- BARTHA, A. et al. Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.19, p.145-151, 1969.
- BAUER, A.G. Primeira constatação do mal de Aujeszky no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v.1, p.15-16, 1955.
- BECKER, Y. et al. Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. **Journal of Virological Methods**, v.40, p.307-322, 1992.
- BELL, S.A. et al. Temporal detection of equine herpesvirus infections of a cohort of mares and their foals. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.249-257, 2006.
- BUONAVOGLIA, C. et al. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.19, n.4, p.275-281, 1996.
- CALNEK, B.W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.255, p.25-55, 2001.
- CARRILLO, B.J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B**, v.30, p.327-332, 1983.
- CHRISTENSEN, L.S. et al. Further evidence of long distance airborne transmission of Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus. **The Veterinary Record**, v.132, p.317-321, 1993.
- d'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.439-534, 1993.
- DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus type 5. **Journal of Virology**, v.77, p.10339-10347, 2003.
- EDINGTON, N.; SMITH, B.; GRIFFITHS, L. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and fetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. **Journal of Comparative Pathology**, v.104, p.379-387, 1991.
- EHLERS, B. et al. Bovine herpesvirus type 2 is closely related to the primate alphaherpesviruses. **Virus Genes**, v.19, p.197-203, 1999.
- ENGELS, M. et al. Goat herpesviruses: biological and physicochemical properties. **The Journal of General Virology**, v.64, p.2237-2247, 1983.
- EVERMANN, J.F. Coital Exantema. In: CASTRO, A.E. & HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic virology**. St Louis: Mosby Year Book. 1992. p.159-160.
- FENNER, F. et al. **Veterinary virology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1993. 666p.
- FORD, R.B. **Feline viral upper respiratory disease: herpesvirus and calicivirus**. In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 30th., Mexico City, Mexico, 2005. **Proceedings...** Disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=10952&O=Generic>. Acesso em 15 dez. 2006.
- FRANCO, A.C. et al. A Brazilian gE-negative bovine herpesvirus type 1.2a is attenuated for cattle and induces protection against wild type virus challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.135-140, 2002.
- FRAZIER, K. et al. Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.502-508, 2001.

- FUCHS, W. et al. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. **Veterinary Research**, v.38, p.261-279, 2007.
- GIBBS, E.P.J.; REWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesvirus. I Bovine herpesvirus 1. II Bovine herpesvirus 2 and 3. **The Veterinary Bulletin**, v.47, p.317-343, 1977.
- GUY, J.S.; BARNES, H.J.; SMITH, L.G. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. **Avian Pathology**, v.21, p.77-86, 1992.
- KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: _____. **Viral diseases of cattle**. 2.ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2001. Cap.18, p.159-170.
- KLUGE, J.P. et al. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). In: STRAW, B.E. et al. (Eds.) **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999. p.233-246.
- METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v.87, p.205-217, 1986.
- MORÉS, N.; ZANELLA, J.C. Programa de erradicação da doença de Aujeszky no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11. **Anais...** Goiânia: UFGO, p.126-131, 2003.
- MÜLLER, T. et al. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.50, p.207-213, 2003.
- MURPHY, F.A. et al. Herpesviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap.18, p.301-326.
- OSORIO, F.A. Bovine mammillitis. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.E. **Veterinary diagnostic virology: a practitioner's guide**. Baltimore: Mosby Year Book, 1992. Cap.26, p.83-85.
- PARSONSON, I.M.; SNOWDON, W.A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.365-369, 1975.
- PATEL, J.R.; HELDENS, J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. **Veterinary Journal**, v.170, p.14-23, 2005.
- POVEY, R.C.; JAMES, Z.H. Bovine herpes mammillitis virus and vulvovaginitis. **The Veterinary Record**, v.92, p.224-229, 1973.
- RECH, R.R. et al. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, p.97-105, 2005.
- ROCK, D.L. Latent infection with bovine herpesvirus type-1. **Seminars in Virology**, v.5, p.233-240, 1994.
- ROIZMAN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v.123, p.425-449, 1992.
- ROIZMAN, B.; PELLET, P.E. The Family Herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.71, p.2381-2397.
- ROPERTO, F. et al. Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, p.298-302, 2000.
- SALVADOR, S.C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, p.76-83, 1998.
- SILVA, A.D. et al. Virological findings from the recent outbreak of Aujeszky's disease in Rio Grande do Sul. **Virus Review and Research**, v.8, p.133-134, 2003.
- SILVA, A.M. et al. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Veterinary Microbiology**, v.66, p.89-99, 1999.
- SIX, A. et al. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) in calves. **Archives of Virology**, v.146, p.1325-1335, 2001.
- TEMPESTA, M. et al. A preliminary study on the pathogenicity of a strain of caprine herpesvirus-1. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.22, p.137-143, 1999b.
- TEMPESTA, M. et al. Experimental intravaginal infection of goats with caprine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.47, p.197-201, 2000.
- THIRY, J. et al. A live attenuated glycoprotein E negative herpesvirus 1 vaccine induces a partial cross-protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. **Veterinary Microbiology**, v.113, p.303-308, 2006.
- TIKOO, S.K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v.45, p.191-217, 1995.
- VAN MAANEN, C. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. **The Veterinary Quarterly**, v.24, p.58-78, 2002.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine viral vaccines, diagnostics and eradication: past, present and future. **Advances in Veterinary Medicine**, v.41, p.197-215, 1999.
- VOGEL, F.S.F. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4512-4520, 2003.

VOGEL, F.S.F. et al. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.185-196, 2004.

WEIBLEN R. al. Bovine meningo-encefalitis from IBR virus. **The Veterinary Record**, v.124, p.666-667, 1989.

WITTER, R.L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. **Avian Diseases**, v.41, p.149-163, 1997.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMAN, G. (Ed). **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Hingham, MA: Kluwer, 1989. p.1-72.

1 Introdução	491
2 Classificação	491
3 Estrutura dos vírions	493
3.1 O genoma	493
4 Replicação	495
5 Poxvírus de interesse veterinário	497
5.1 Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	497
5.1.1 Vírus da vaccinia	497
5.1.2 Vírus da varíola dos bubalinos	498
5.1.3 Vírus da varíola bovina	498
5.1.4 Vírus da varíola dos camelos	498
5.1.5 Vírus da varíola dos macacos	499
5.1.6 Vírus da ectromelia	499
5.1.7 Vírus Uasin Gishu	499
5.2 Gênero <i>Capripoxvirus</i>	500
5.2.1 Vírus da varíola ovina e caprina	500
5.2.2 Vírus da doença da pele nodulosa	501
5.3 Gênero <i>Suipoxvirus</i>	502
5.3.1 Vírus da varíola suína	502
5.4 Gênero <i>Molluscipoxvirus</i>	503
5.4.1 Vírus do <i>Molluscum contagiosum</i>	503
5.5 Gênero <i>Yatapoxvirus</i>	503
5.5.1 Vírus yabapox e tanapox	503
5.6 Gênero <i>Avipoxvirus</i>	504
5.6.1 Vírus da bouba aviária	504

5.7 Gênero <i>Leporipoxvirus</i>	505
5.7.1 Vírus do mixoma dos coelhos	505
5.8 Gênero <i>Parapoxvirus</i>	506
5.8.1 Vírus do ectima contagioso	506
5.8.2 Vírus da pseudovariola bovina	508
5.8.3 Vírus da estomatite papular bovina	509
6 Os poxvírus como vetores de expressão	509
7 Bibliografia consultada	511

1 Introdução

Os membros da família *Poxviridae* infectam diversas espécies de invertebrados e vertebrados, incluindo o homem. Os poxvírus foram os primeiros vírus estudados intensivamente em laboratório, pois podem ser visualizados sob microscopia ótica. Também foram os primeiros vírus a serem multiplicados e titulados em cultivo celular, purificados fisicamente e caracterizados quimicamente.

A história da imunologia e a vacinologia está fortemente ligada a esses vírus, pois as observações iniciais de proteção, associada com exposição deliberada a agentes infecciosos se devem a Edward Jenner, nos clássicos estudos com os vírus da varíola bovina e humana. Além disso, o agente da varíola também foi o primeiro vírus erradicado da população humana, em 1979, após décadas de programas maciços de vacinação em todo o mundo.

Apesar da erradicação da varíola, considerada uma das principais moléstias infecciosas humanas em todos os tempos, o interesse nos poxvírus tem se renovado nos últimos anos. Parte desse interesse se deve à possibilidade de se utilizar o genoma dos poxvírus para clonar e expressar genes heterólogos para uso em vacinas, como foi feito na vacina utilizada para o controle da raiva silvestre em canídeos na Europa. Outra fonte recente de interesse nesses vírus advém da temeridade do seu uso potencial em bioterrorismo. Os poxvírus também são muito estudados como exemplos de interações complexas entre os vírus e seus hospedeiros, pois o seu genoma codifica uma série de proteínas que interagem com os mecanismos imunológicos desencadeados em resposta à infecção.

As principais propriedades dos poxvírus são: a) possuem vírions grandes e complexos; b) os vírions contêm diversas enzimas para a síntese e modificação de RNAs mensageiros (mRNA); c) o genoma consiste de uma molécula de DNA de

fita dupla com 130 a 300 kb; d) realizam a sua replicação inteiramente no citoplasma.

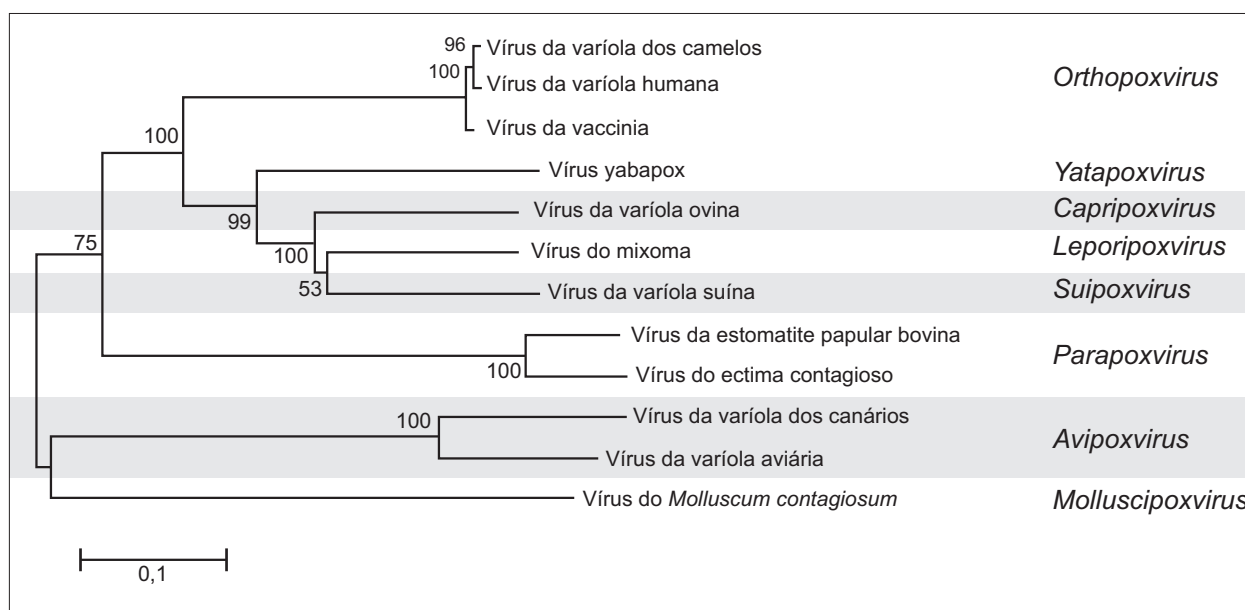
A gama de hospedeiros das diferentes espécies de poxvírus varia de extremamente restrita a excessivamente ampla. A severidade da infecção também varia muito de uma espécie para outra, podendo resultar desde infecção autolimitante local até doença sistêmica devastadora, como no caso da varíola. Não obstante, a doença típica dos poxvírus acomete a pele, embora sinais clínicos generalizados possam estar presentes. A doença nas aves é predominantemente proliferativa, enquanto nos mamíferos predominam as lesões vesiculares e pustulares.

2 Classificação

Os membros da *Poxviridae* são subdivididos em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae*, que contém vírus que infectam insetos; e *Chordopoxvirinae*, cujos membros infectam os vertebrados e serão os objetos deste capítulo. A subfamília *Chordopoxvirinae* é formada por oito gêneros, denominados *Orthopoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Parapoxvirus*. O protótipo da família é o vírus da vaccinia (VV), cujos hospedeiros naturais e origem permanecem controversos. Esse vírus foi isolado inicialmente de búfalos, mas parece ter sido transmitido para esses animais por humanos. A Tabela 18.1 apresenta a classificação das principais espécies de poxvírus que infectam os animais domésticos e a sua distribuição geográfica. Os membros de um gênero são relacionados genética e antigenicamente entre si, além de possuírem a morfologia das partículas e a gama de hospedeiros similares. No entanto, também existe alguma reatividade sorológica cruzada entre vírus de diferentes gêneros, apesar da identidade genética ser menor do que 75%. A Figura 18.1 apresenta uma árvore filogenética para ilustrar a relação genética entre os gêneros e espécies dessa família.

Tabela 18.1. Principais poxvírus que infectam os animais domésticos e o homem, seus hospedeiros e distribuição geográfica.

Gênero	Espécie	Hospedeiro	Distribuição geográfica
Orthopoxvirus	Vírus da varíola	Humanos	Erradicado
	Vírus da vaccínia	Vários: humanos, bovinos, suínos, coelhos	Todo mundo
	Vírus da varíola bovina	Vários: bovinos, humanos, roedores, felídeos etc.	Europa e Ásia
	Vírus da varíola dos camelos	Camelos	Ásia e África
	Vírus Uasin Gishu	Vários, eqüinos	Leste da África
	Vírus da varíola dos macacos	Vários, macacos, humanos, esquilos	Oeste e Centro da África
	Vírus da ectromelia	Camundongos	Europa
Capripoxvirus	Vírus da varíola dos ovinos	Ovinos e caprinos	África
	Vírus da varíola dos caprinos	Ovinos e caprinos	África
	Vírus da doença da pele nodulosa	Bovinos e búfalos	África e Ásia
Suipoxvirus	Vírus da varíola dos suínos	Suínos	Todo o mundo
Avipoxvirus	Vírus da varíola (bouba) aviária	Galinhas, perus, canários, pombas, outras aves	Todo o mundo
Leporipoxvirus	Vírus do mixoma	Coelhos	Américas, Austrália, Europa
Molluscipoxvirus	Vírus do <i>molluscum contagiosum</i>	Humanos	Todo o mundo
Yatapoxvirus	Vírus yabapox e vírus tanapox	Humanos e macacos	Oeste da África
Parapoxvirus	Vírus da pseudovaríola bovina	Bovinos, humanos	Todo o mundo
	Vírus da estomatite papular bovina	Bovinos, humanos	Todo o mundo
	Vírus orf (ectima contagioso)	Ovinos, caprinos, humanos	Todo o mundo
	Vírus Ausdik	Camelos	África, Ásia
	Parapoxvírus das baleias	Baleias, humanos	Todo o mundo



Fonte: André Felipe Streck

Figura 18.1. Árvore filogenética construída a partir da análise do gene que codifica a DNA polimerase de espécies dos diferentes gêneros da família *Poxviridae*. A análise foi realizada pelo método de Neighbor-Joining (10.000 repetições) e utilizada a matriz de substituição Dayhoff Matrix Model (PAM). O comprimento dos ramos é dado pelo número de substituições por sítio.

3 Estrutura dos vírions

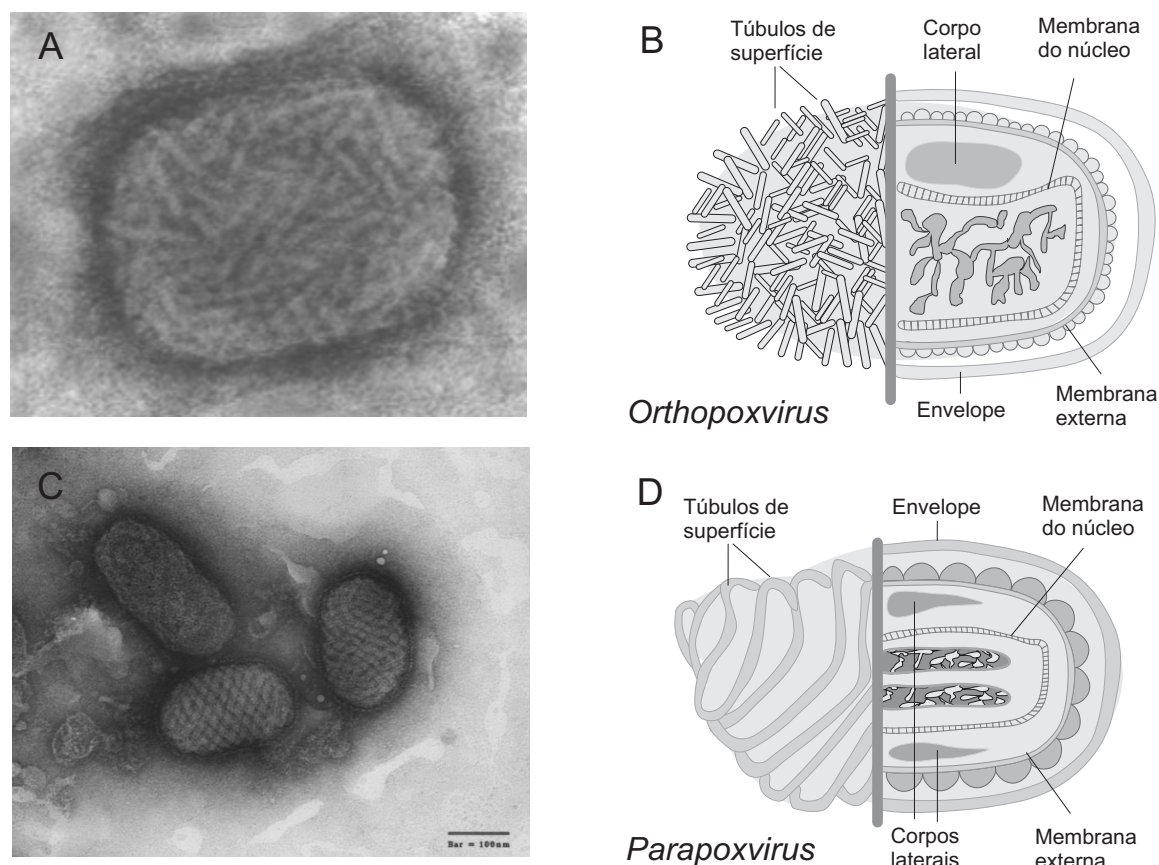
Os vírions dos membros da família *Poxviridae* são grandes e complexos e contêm as enzimas necessárias para a síntese de mRNA. A arquitetura do nucleocapsídeo é complexa, já que não possui a simetria isomérica icosaédrica ou helicoidal encontrados na maioria dos outros vírus. Os vírions possuem a forma de um tijolo arredondado, com dimensões que variam de 170 a 260 nm de largura/espessura por 300 a 450 nm de extensão. Os vírions do VV apresentam a forma de retângulos arredondados, com dimensões de 270 x 360 nm. O envelope lipoprotéico de 30 nm de espessura envolve duas estruturas laterais (corpos laterais) e um núcleo (Figura 18.2). Uma forma extracelular do vírion possui um envelope adicional externo em relação a sua forma intracelular. O envelope adicional é adquirido pelo brotamento através da membrana plasmática; os vírions desprovidos do envelope adicional são liberados por lise celular e são menos infecciosos. Os vírions intracelulares desprovidos do envelope adicional são denominados IMV (*intracellular mature virions*), e os extracelulares com o duplo envelope são chamados de EEV (*extracellular enveloped virions*). A Figura 18.2 apresenta fotografias de microscopia eletrô-

nica de dois poxvírus diferentes e uma ilustração esquemática dos respectivos vírions.

3.1 O genoma

O genoma dos poxvírus consiste de uma molécula de DNA linear de fita dupla com 130 kb (parapoxvírus) a 300 kb (avipoxvírus). O genoma contém seqüências repetidas invertidas do tipo *hairpin* (ITRs) de 0,1 a 12,4 kb nas extremidades e uma região única longa que ocupa a região central (Figura 18.3). As duas cadeias de DNA que compõem o duplex são unidas entre si nas extremidades por curvas (*loops*). As regiões que formam as curvas são ricas em A-T e não são complementares, não permitindo o pareamento entre elas.

Aproximadamente 50 seqüências genômicas completas de diferentes poxvírus já foram obtidas, permitindo uma descrição detalhada da estrutura, organização genômica e dos genes individuais. Nos *Chordopoxvirus*, o número de genes é de aproximadamente 150, embora mais de 300 genes já tenham sido deduzidos no genoma do poxvírus do canário. Aproximadamente 90 dos 150 genes são conservados no genoma de todos os *Chordopoxvirus* e codificam produtos que par-



Fonte: ME: Dr Stewart McNulty; qub.ac.uk. Ilustrações: adaptadas de Murphy et al.(1999).

Figura 18.2. Vírions de membros da família *Poxviridae* (esquerda: fotos de microscopia eletrônica; direita: ilustração esquemática dos vírions). A, B) Vírions do gênero *Orthopoxvirus*; C, D) Vírions do gênero *Parapoxvirus*. Barra = 100 nm.



Fonte: adaptado de Murphy et al. (1999).

Figura 18.3. Ilustração esquemática da estrutura do genoma dos poxvírus. O genoma é constituído por uma molécula de DNA de cadeia dupla cuja região mais longa é única e apresenta as cadeias complementares e pareadas. Próximas às extremidades do genoma existem regiões repetidas na orientação inversa, ricas em A-T, que não são exatamente complementares e, por isso, não estão pareadas. As extremidades do genoma são unidas entre si, formando uma inflexão (loop) e conferindo continuidade à molécula de DNA.

ticipam da replicação do DNA, da transcrição, da morfogênese e da estrutura das partículas virais. Os genes mais conservados se localizam na região central do genoma, e os genes localizados entre a região central e as extremidades do genoma tendem a ser espécie-específicos e codificam proteínas cujas funções antagonizam a resposta imune do hospedeiro. Esses genes são chamados coletivamente de genes de virulência. Ao contrário dos genes centrais conservados, vários genes de virulência são dispensáveis para a replicação viral em cultivo celular.

Uma das dezenas de proteínas codificadas pelo genoma viral (peso molecular de 58 kDa) forma os túbulos da superfície do vírion, que induzem a produção de anticorpos neutralizantes e inibidores da fusão celular. Oito proteínas, incluindo uma hemaglutinina, foram identificadas no envelope externo dos vírions extracelulares e pelo menos quatro proteínas estão conjugadas com o DNA genômico. Os poxvírus codificam várias proteínas envolvidas na evasão e modulação da resposta imunológica do hospedeiro. Alguns genes provavelmente foram adquiridos recentemente dos hospedeiros por recombinação, pela sua semelhança com genes encontrados nas espécies animais infectadas. Esses genes codificam produtos envolvidos na resposta imune do hospedeiro (MHC classe I, interleucinas 10, 18 e 24, receptores do interferon gama e do fator de necrose tumoral II), além de outros envolvidos na resistência das células ao estresse oxidativo (glutaredoxina e glutathione peroxidase). Essa captura de genes do hospedeiro tem sido uma característica decorrente na evolução dos poxvírus e parece desempenhar um papel na adaptação desses vírus para resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, pelo bloqueio da atividade de várias citocinas, quimiocinas, serion-proteases e complemento, entre outras. Essa diversidade de estratégias utilizadas pelos poxvírus para assegurar a sua sobrevivência tem propiciado o conhecimento de vários aspectos da imunologia, virologia e inflamação. Devido a natureza antiinflamatória de várias proteínas dos poxvírus, algumas têm demonstrado potencial para o uso terapêutico em inflamações agudas e crônicas.

4 Replicação

A maioria dos poxvírus replica com eficiência em cultivos celulares, com exceção dos parapoxvírus, poxvírus de suínos e vírus do *Molluscum contagiosum*. Esses vírus também podem ser multiplicados em ovos embrionados de galinhas, onde produzem placas (focos) esbranquiçadas (pocks) na membrana corioalantoide.

Os poxvírus codificam todas as enzimas necessárias para a transcrição e replicação do genoma viral. Também trazem, nos vírions, as enzimas para a produção e modificação dos mRNA para a síntese de suas proteínas, o que os tornou independentes do núcleo celular. Após a fusão do vírion com a membrana plasmática ou após a endocitose, o núcleo viral é liberado no citoplasma, onde ocorrem todas as etapas do ciclo replicativo.

O processo de expressão gênica é caracterizado pela transcrição temporal de três classes de genes (genes iniciais, intermediários e tardios). A transcrição de cada grupo de genes requer a presença de fatores de transcrição específicos que são produzidos pelos genes do grupo precedente. A transcrição é iniciada pela RNA polimerase viral e outros fatores presentes no núcleo do vírion, e resulta na produção de mRNAs alguns minutos após a penetração, ainda no genoma não totalmente desnudo. Os mRNAs do VV são detectados 20 minutos após a penetração e atingem picos em aproximadamente 1 a 2 horas após. As proteínas produzidas pela tradução desses mRNAs completam o desnudamento do genoma e a transcrição de aproximadamente 100 genes iniciais. Essas etapas ocorrem previamente ao início da replicação do DNA.

Em células infectadas pelo VV, a replicação do DNA se inicia aproximadamente 1 a 2 horas após a infecção e resulta na produção de até 10.000 cópias do genoma por célula, metade das quais será empacotada na progênie viral. Em outros poxvírus, o início da replicação pode ser mais tardio, como nos parapoxvírus (4-6 h) e poxvírus aviários (12-16 h). O início da replicação parece ocorrer em ambas as extremidades do genoma e envolve a clivagem das cadeias de DNA no sítio de iniciação, seguida de replicação

por deslocamento da cadeia complementar. A replicação do genoma envolve a síntese de longos intermediários concatamerizados (unidos pelas extremidades), que são subsequentemente clivados em unidades genômicas únicas.

Após o início da replicação, ocorre uma mudança dramática na expressão gênica, quando os produtos dos genes iniciais se ligam aos promotores de genes intermediários e tardios, ativando a sua transcrição e conseqüente expressão. Alguns fatores de transcrição de genes iniciais são sintetizados tardiamente na infecção e empacotados nos vírions para serem utilizados no início do próximo ciclo de infecção.

Pelo fato de os vírions serem constituídos por um grande número de proteínas, é razoável

que a produção da progênie dos poxvírus também seja um processo complexo e que necessite várias horas para ser completada. A replicação e a produção de vírions ocorrem em determinados locais do citoplasma, denominados viroplasmas ou fábricas de vírus. Os vírions envelopados são liberados através de brotamento, e os vírions não-envelopados podem ser liberados por brotamento ou lise da célula. Ambas as formas dos vírions são infecciosas, embora as formas envelopadas infectem novas células mais rapidamente e parecem ser mais importantes na disseminação do vírus no organismo do hospedeiro. O ciclo replicativo dos poxvírus está ilustrado esquematicamente na Figura 18.4.

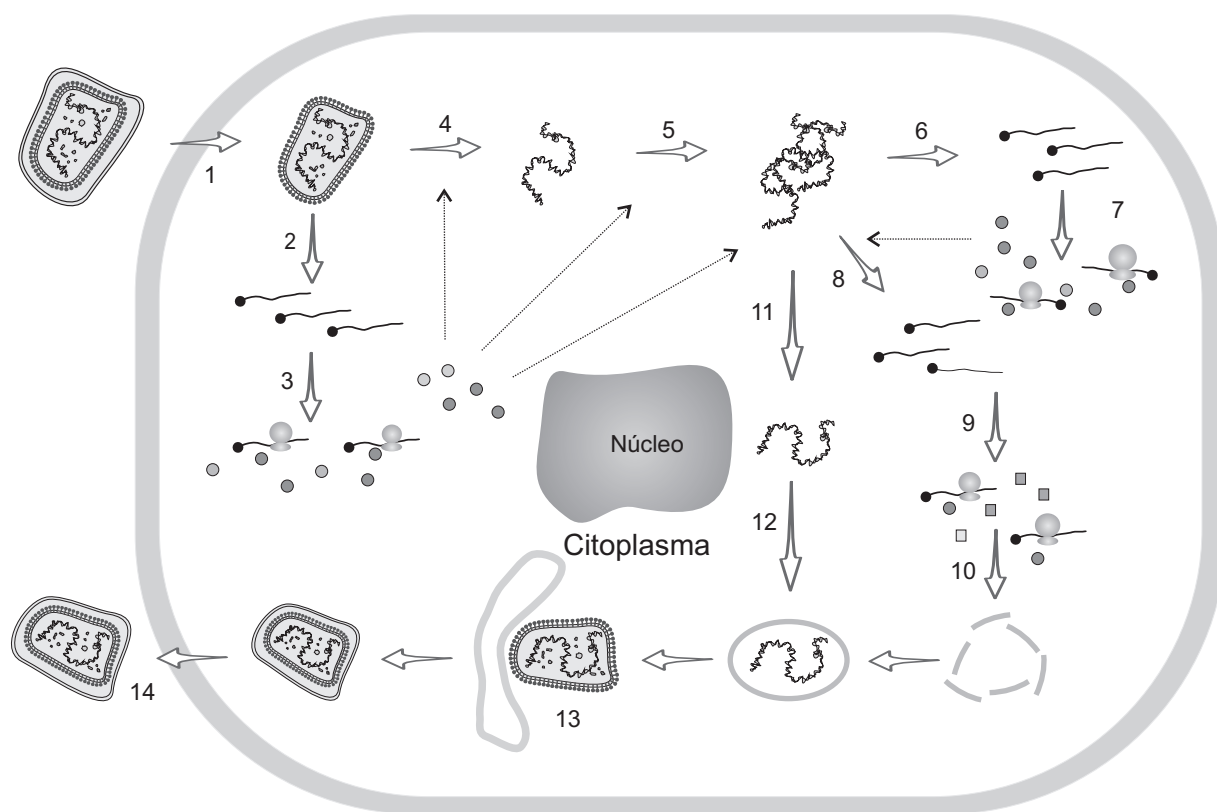


Figura 18.4. Ciclo replicativo dos poxvírus. Os vírions se ligam a receptores de superfície e penetram por fusão do envelope com a membrana plasmática, liberando o núcleo (core) no citoplasma (1). As enzimas trazidas nos vírions sintetizam os mRNAs dos genes iniciais (2) que são traduzidos em proteínas iniciais (3). As proteínas iniciais participam do desnudamento completo do genoma (4), na sua replicação (5) e na transcrição dos genes intermediários (6), cujos mRNAs são traduzidos em proteínas (7). As proteínas intermediárias estão envolvidas principalmente na transcrição dos genes tardios (8), e participam das fases finais de replicação (resolução e separação das moléculas-filhas de DNA) (11,12). As proteínas tardias (9) fazem parte da estrutura vírica e participam da morfogênese dos núcleos virais (10), que adquirem o envelope pelo brotamento no aparelho de Golgi (13) e são liberados da célula (14).

5 Poxvírus de interesse veterinário

Somente dois poxvírus são específicos do homem: o vírus da varíola e o vírus do *Molluscum contagiosum*. Seis outras espécies de poxvírus podem, esporadicamente, causar infecções zoonóticas. A Tabela 18.1 apresenta os principais poxvírus de interesse veterinário, os quais serão detalhados a seguir.

5.1 Gênero *Orthopoxvirus*

Os ortopoxvírus são morfologicamente indistinguíveis entre si e a sua replicação produz corpúsculos de inclusão citoplasmáticos. Os membros desse gênero são antigenicamente relacionados e, por isso, um vírus pode ser utilizado em vacina para induzir imunidade protetora contra os demais. Essa imunidade parece ser de longa duração.

Apesar de sua semelhança, esses vírus podem ser distinguidos por sorologia, aspectos morfológicos, temperatura em que produzem lesões na membrana corioalantóide de embriões de galinha, por eletroforese de proteínas, técnicas de caracterização genética e efeito citopático em cultivos celulares. As lesões podem estar confinadas a regiões específicas da pele ou serem sistêmicas. As lesões de pele geralmente iniciam como pápulas, que evoluem para pústulas e crostas.

Os hospedeiros naturais de várias espécies de ortopoxvírus ainda não estão bem definidos e, possivelmente, incluem várias espécies de roedores silvestres. Na maioria das infecções, o diagnóstico pode ser realizado por microscopia eletrônica (ME) de material coletado das bordas das lesões ou por isolamento viral. O isolamento pode ser realizado pela inoculação do material suspeito na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha, em cultivos celulares e em animais de laboratório, pela inoculação após escarificação da pele.

5.1.1 Vírus da vaccinia

O vírus da vaccinia (VV) é o protótipo do gênero *Orthopoxvirus* e foi amplamente utilizado na formulação de vacinas para o controle e erra-

dicação da varíola humana. O VV possui uma distribuição muito ampla e é capaz de infectar uma grande variedade de espécies animais, em algumas das quais produz doença clinicamente semelhante à causada pelos poxvírus específicos de cada hospedeiro. A sua ocorrência em rebanhos leiteiros, em épocas anteriores a interrupção da vacinação contra a varíola humana, era frequentemente associada com manifestações clínicas semelhantes e, por isso, atribuídas ao vírus da varíola bovina. Após a interrupção da vacinação contra a varíola humana, acredita-se que praticamente a totalidade dos casos de varíola bovina seja, de fato, associada com o vírus bovino.

No entanto, desde 1999, vários surtos de doença exantematosa e vesicular têm sido relatados em bovinos leiteiros na região Sudeste do Brasil. Os surtos geralmente ocorrem em propriedades que realizam ordenha manual, sem os cuidados adequados de higiene. Em parte desses eventos, as lesões foram observadas concomitantemente em pessoas e vacas. Nas vacas, as lesões são semelhantes às descritas nos casos de infecção pelo VV. As lesões iniciais nas tetas e úbere se caracterizam por eritema róseo e edema localizado, que leva à formação de vesículas. As vesículas rapidamente evoluem para pápulas e pústulas que, posteriormente, se rompem e supuram. O próximo estágio é caracterizado pela formação de crostas escuras, algumas vezes recobrendo grandes áreas que podem, subsequente, ulcerar. O curso da doença pode durar entre três e quatro semanas. A ocorrência de contaminação bacteriana secundária pode resultar em mastite. Bezerros que se amamentam nas vacas afetadas desenvolvem lesões no focinho e na mucosa oral. As pessoas afetadas são geralmente aquelas que realizam a ordenha, apresentando lesões nas mãos, indicando que foram infectadas pelo contato com os animais. Algumas pessoas relatam a ocorrência de cefaléia, dores musculares, hipertermia e linfadenopatia.

Um dos primeiros vírus caracterizados a partir desses eventos foi denominado Cantagalo, por ter sido isolado de um surto de doença vesicular bovina e humana no município com este nome no estado do Rio de Janeiro, em 1999. A análise biológica e molecular revelou que esse ví-

rus é mais semelhante ao VV do que ao poxvírus da varíola bovina. Além disso, o vírus Cantagalo é muito semelhante geneticamente ao VV antigamente utilizado em vacinas humanas contra a varíola. Esses achados sugerem que este vírus pode ter se originado do VV vacinal, que provavelmente persistiu durante anos em alguma espécie de hospedeiro silvestre e, eventualmente, reemergiu, infectando bovinos e pessoas.

Após esse evento, vários surtos de doença semelhante, com caráter zoonótico, têm sido descritos em várias regiões do país, principalmente na região Sudeste. Além disso, todos os ortopoxvírus isolados desde 1963, no país, foram identificados como derivados do VV. A caracterização de alguns desses vírus isolados nos surtos recentes reforça a hipótese da persistência do VV em hospedeiros silvestres no Brasil e a sua reemergência como importante patógeno de bovinos.

5.1.2 Vírus da varíola dos bubalinos

O poxvírus dos búfalos (*buffalopox*) é causado por um vírus tão semelhante ao VV que não é claro se representa uma espécie viral distinta ou não. Surtos dessa doença têm ocorrido nos búfalos-da-água (*Bubalis bubalis*) na Índia, Indonésia e Egito. Como foi mencionado acima, vários surtos causados pelo VV – ou vírus geneticamente muito semelhantes – ocorreram no Brasil desde 1999, o que resultou em perdas econômicas e afetou a saúde dos fazendeiros que, provavelmente, se infectaram por contato direto com seus bovinos durante a ordenha.

As lesões pustulares nas tetas e úbere de búfalas e vacas produtoras de leite assemelham-se àsquelas causadas pelo vírus da varíola bovina. Em eqüinos, a infecção resulta em uma apresentação clínica semelhante à varíola eqüina ou dermatite papular eqüina. O diagnóstico pode ser confirmado por histopatologia, ME ou por isolamento do vírus.

5.1.3 Vírus da varíola bovina

A varíola bovina (*cowpox*) ocorre principalmente na Europa e nas regiões adjacentes da

Rússia. Os hospedeiros naturais do vírus são várias espécies de roedores silvestres. Estes animais atuam como reservatórios do vírus, a partir dos quais pode ser transmitido para várias espécies domésticas e silvestres. As características clínicas e as doenças associadas são muito semelhantes às causadas pelo VV, embora os vírus sejam antigenicamente distintos. Em vacas leiteiras, as lesões estão geralmente confinadas aos tetos. Nos gatos, a doença é mais facilmente reconhecida e afeta principalmente os animais que vivem em áreas rurais e são bons caçadores. Outro fato que indica que os roedores se constituem nos hospedeiros naturais do vírus é que a doença tem maior incidência no outono, quando a população de roedores é maior. Nos gatos, os sinais clínicos iniciam com pequenas pápulas na cabeça e membros anteriores, podendo ulcerar, seguido pela formação de crostas. Uma apresentação mais rara envolve coriza, conjuntivite e pneumonia, provavelmente advinda de contaminação bacteriana secundária ou imunodepressão causada pelo vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da imunodeficiência felina (FIV). Eventualmente os gatos podem transmitir a doença para o homem, que geralmente desenvolve uma única erupção maculopapular na mão ou na face. A seguir, podem advir sinais sistêmicos, como náusea, febre e adenopatia. O curso da doença é mais severo em crianças e, embora raro, pode resultar em morte. Vários surtos da doença em zoológicos são descritos na literatura, especialmente afetando os grandes felinos (chita, ocelote, lince, jaguar, puma, leão e panteira), além de rinocerontes, elefantes e ocapis, com as chitas apresentando uma alta taxa de mortalidade.

O diagnóstico pode ser confirmado por histopatologia, ME ou isolamento do vírus. Doenças causadas pelo VV, vírus da mamilitite herpética (herpesvírus bovino tipo 2 – BoHV-2), devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da doença em bovinos. As medidas profiláticas têm pouco impacto no controle e prevenção da doença.

5.1.4 Vírus da varíola dos camelos

O vírus da varíola dos camelos (*camelpox*) causa uma doença generalizada severa que cursa

com o desenvolvimento de um grande número de lesões na pele. A forma mais severa ocorre principalmente nos animais jovens, podendo causar uma mortalidade de até 25%. Este vírus é distinguível dos outros ortopoxvírus através do perfil gerado por restrição enzimática do genoma. A doença tem importância nas regiões em que os camelos são criados para transporte e produção de leite, como na África, Oriente Médio e sudoeste da Ásia.

Este vírus aparentemente não infecta humanos, apesar da freqüente exposição de pessoas aos animais infectados. Assim, a doença é aparentemente restrita aos camelos. Um parapoxvírus (vírus de Ausdyk) também infecta camelos e causa um quadro clínico semelhante.

5.1.5 Vírus da varíola dos macacos

Apesar de seu nome, os hospedeiros naturais desse vírus parecem ser os esquilos. Esse vírus é zoonótico e geralmente afeta pessoas que caçam macacos e esquilos, para a sua alimentação, na África Central e Ocidental. Nos últimos anos, vários casos e surtos localizados dessa doença têm sido relatados em pessoas na África. A transmissão do vírus entre pessoas é incomum e, assim, parece ser improvável que a doença se estabeleça e se perpetue na população. É mais provável que a doença continue a ocorrer esporadicamente em pessoas que se expõem ao agente pelo contato com os hospedeiros naturais. Os sinais clínicos são semelhantes aos da varíola humana, e a enfermidade pode ser prevenida utilizando-se imunização com o VV.

5.1.6 Vírus da ectromelia

O vírus da varíola dos camundongos (*mousepox*), ou vírus da ectromelia, disseminou-se no mundo todo através do transporte de camundongos de laboratório e seus produtos. Existem duas formas de apresentação clínica: uma fatal aguda, em que ocorre uma extensiva necrose do baço e fígado, com a morte ocorrendo poucas horas após o início dos sinais; e a outra crônica, caracterizada por lesões ulcerativas nos pés, cauda e focinho. A transmissão ocorre por pequenas abrasões na pele e por via respiratória. Uma forma importante de

introdução do vírus em colônias de camundongos é através de soro de camundongo, líquido ascítico, tumores e tecidos. Algumas linhagens são mais resistentes, e a apresentação clínica pode ser leve ou inaparente (C56BL/6, AKR), já outras são muito sensíveis (BALB/c, C3H, DBA).

A infecção pelo vírus da ectromelia tem sido extensivamente utilizada como modelo para o estudo da patogenia de infecções víricas sistêmicas. Após a penetração e replicação próxima ao local de entrada (geralmente a pele), onde a replicação produz uma pequena lesão papular, o vírus replica nos linfonodos regionais e produz uma viremia primária. Esta viremia permite ao vírus atingir vários órgãos, entre eles o fígado e o baço, onde replica e produz necrose. Essa replicação é seguida de uma viremia secundária, pela qual o vírus atinge outros órgãos, inclusive a pele, produzindo as lesões máculo-papulares e vesiculares características. Estas lesões são seguidas de prurido intenso e ulceração e se constituem na via de excreção do agente. Dentre os modelos de patogenia, o do vírus da ectromelia é um dos mais clássicos, e muitas informações sobre a patogenia das infecções víricas foram obtidas a partir desse modelo.

A introdução desse vírus em uma colônia tem consequências devastadoras, desta forma, o diagnóstico deve ser feito rapidamente. A varíola dos camundongos pode ser diagnosticada por histopatologia, sendo observados corpúsculos de inclusão citoplasmáticos eosinofílicos nas bordas das lesões de pele. Através de ME, podem ser observados vírions em qualquer tecido infectado. O vírus também pode ser isolado em cultivos de células de embrião de camundongo e identificado por técnicas imunológicas.

A prevenção e o controle são baseados na quarentena e regras de importação de vírus, de camundongos e seus produtos que podem carrear o vírus. O monitoramento sorológico regular das colônias também deve ser feito, principalmente para diagnosticar as infecções subclínicas.

5.1.7 Vírus Uasin Gishu

O vírus Uasin Gishu, vírus da varíola dos cavalos, tem sido isolado somente no Leste da África. Podem ser encontradas duas formas da

doença: uma em que as lesões vesiculares se desenvolvem e outra que apresenta lesões múltiplas na mucosa oral.

5.2 Gênero *Capripoxvirus*

5.2.1 Vírus da varíola ovina e caprina

Dentre as doenças causadas pelos poxvírus, a varíola dos ovinos (*sheeppox*) e a varíola dos caprinos (*goatpox*) estão entre as mais importantes em medicina veterinária. Essas doenças são de notificação obrigatória na maioria dos países onde ocorrem, e o seu diagnóstico é essencial para o comércio e trânsito internacional de pequenos ruminantes.

5.2.1.1 Epidemiologia

As varíolas ovina e caprina ocorrem no sudoeste da Ásia, Índia e na maior parte da África, embora a distribuição geográfica dos dois vírus seja diferente. Essa distribuição geográfica distinta sugere que essas doenças sejam causadas por vírus diferentes. Contudo, estes vírus não podem ser diferenciados através de sorologia e a análise de restrição do genoma indica que são geneticamente muito semelhantes. As cepas de vírus da varíola dos ovinos parecem ser mais relacionadas com o vírus da pele nodulosa (*lumpy skin*) do que com o vírus da varíola dos caprinos.

Nos animais infectados, o vírus é excretado nas exsudações e descamações de lesões de pele, além de secreções nasais e oculares durante a fase aguda da doença. A infecção ocorre pela inalação de aerossóis ou por feridas e abrasões na pele, além da picada de insetos. A estabulação e o confinamento dos animais facilitam esta forma de transmissão.

Após a recuperação clínica da doença, os animais ficam imunes a reinfecções pelo mesmo vírus. Por isso, em áreas endêmicas, a doença generalizada e a mortalidade são raras. Já em rebanhos livres da doença, a sua introdução pode resultar em surtos graves. Animais de todas as idades são susceptíveis, embora os mais jovens sejam acometidos com maior severidade.

5.2.1.2 Patogenia e sinais clínicos

Os sinais clínicos variam entre as raças e apresentam variações de acordo com as regiões geográficas de ocorrência da doença. Após aproximadamente uma semana de incubação, durante a qual ocorre uma viremia, o vírus dissemina-se para a pele, linfonodos, baço, rins e pulmões. A replicação viral nesses tecidos resulta em sintomatologia clínica, como febre, rinite, dispnéia, edema de pálpebras e conjuntivite. Os animais arqueiam o dorso e param de se alimentar. As lesões de pele iniciam por pequenas vesículas que evoluem para pápulas, pústulas, necrose e formação de crostas. Essas lesões são mais abundantes nos lábios, língua, gengiva, narinas externas e pele, principalmente nos locais com cobertura escassa de lã. Lesões também podem ocorrer no trato digestivo, respiratório, fígado, rins e outros. No caso da varíola caprina, a mortalidade pode chegar a 50%, quando acomete raças nativas, e até 100% em raças européias. Em rebanhos susceptíveis de ovinos, a doença pode afetar mais de 75% dos animais e causar uma mortalidade de até 50%. Em cordeiros jovens, a mortalidade pode atingir 100%.

5.2.1.3 Diagnóstico e controle

Na maioria dos casos, o diagnóstico pode ser realizado com bases nos achados clínicos. Dificuldades podem ser encontradas quando houver a presença simultânea do vírus do ectima contagioso (orf), ou em rebanhos parcialmente imunes, nos quais a doença pode ser branda. Fragmentos de pele ou tecidos podem ser obtidos por biópsia para a confirmação do diagnóstico através de exames histológicos, ME ou por isolamento viral em células de ovinos ou caprinos. Em alguns países, existe um teste comercial de captura de antígeno para a detecção do vírus da varíola caprina. Para a sorologia, podem ser utilizadas a soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI).

Vírus atenuados e inativados têm sido utilizados na formulação de vacinas para uso nas regiões onde essas doenças são endêmicas. A vacinação deve ser repetida anualmente, e a resposta

induzida pelas vacinas com vírus atenuados tem sido melhor, provavelmente porque a imunidade mediada por células é a mais importante para a proteção. Esses vírus também têm sido testados como vetores para a confecção de vacinas contra outras viroses de pequenos ruminantes.

5.2.2 Vírus da doença da pele nodulosa

A doença da pele nodulosa (*lumpy skin disease*, LSD) é uma enfermidade aguda ou subaguda – ou mesmo cursa como infecção subclínica – de bovinos que se caracteriza por febre e formação de múltiplos nódulos firmes na pele, placas necróticas nas mucosas e infartamento de linfonodos periféricos. A doença é clinicamente semelhante à manifestação cutânea disseminada que ocorre na infecção pelo BoHV-2, denominada *pseudo lumpy skin disease*.

O agente etiológico (*lumpy skin disease virus*, LSDV) é um poxvírus, originário provavelmente de caprinos, cujo protótipo e primeiro isolado foi denominado vírus Neethling. Este agente é genética e antigenicamente relacionado aos poxvírus de ovinos e caprinos. Essa semelhança tem permitido o uso do poxvírus de ovinos em vacinas para o controle da LSD em bovinos em alguns países.

O LSDV replica em altos títulos em uma variedade de células de cultivo, mas os isolados de campo demoram a produzir efeito citopático após o seu isolamento. O vírus também pode ser multiplicado em embriões de pinto e na membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha. O vírus é muito estável sob condições ambientais, podendo manter a sua viabilidade em crostas por até 30 dias.

5.2.2.1 Epidemiologia

A LSD disseminou-se progressivamente durante o último século por toda a África, onde segue causando surtos com grande frequência. O agente foi responsabilizado por somente um surto fora desse continente, em Israel, em 1989. A principal forma de disseminação da doença é através de picadas de insetos hematófagos. Por isso os surtos geralmente ocorrem em épocas de grande abundância desses vetores (estações chuvosas).

De um foco inicial, a doença pode disseminar-se por longas distâncias. Os mais prováveis meios de manutenção do vírus entre as epidemias são os bovinos com infecção subclínica ou animais silvestres, possivelmente alguns bubalinos. As raças bovinas européias são mais susceptíveis do que as zebuínas. A doença não apresenta mortalidade considerável, mas pode trazer prejuízos econômicos importantes devido ao longo tempo em que causa condição debilitante, durante a qual os animais se alimentam pouco e perdem peso. A ocorrência periódica de surtos em vários países africanos reforça a necessidade de se adotar medidas de combate à enfermidade.

5.2.2.2 Patogenia e sinais clínicos

No início da doença, os animais perdem o apetite e apresentam lacrimejamento e descarga nasal. Na maioria dos animais afetados, ocorre um infartamento generalizado dos linfonodos superficiais. A doença é caracterizada por febre bifásica, que é seguida pelo aparecimento de nódulos na pele que, subsequente, se tornam necróticos. Essas lesões envolvem a derme e a epiderme. Nódulos também são observados na mucosa da boca e narinas.

Algumas lesões cutâneas ou nas mucosas podem ser maiores e apresentarem uma região central de tecido necrótico que, posteriormente, perde a pele e resulta em úlceras profundas. Essas úlceras podem levar vários meses para cicatrizar. Vários nódulos podem coalescer e formar grandes placas. As lesões cutâneas se resolvem rapidamente ou persistem como grandes úlceras por até meses. Miíases ou infecções bacterianas secundárias podem complicar a enfermidade. Os animais com infecções sistêmicas podem ficar muito debilitados e podem ocorrer abortos. A taxa de mortalidade é normalmente inferior a 5%, mas o desempenho produtivo prejudicado dos animais infectados pode ocasionar grandes perdas econômicas para os rebanhos atingidos.

A imunidade adquirida após a recuperação da doença geralmente dura pelo resto da vida do animal. Bezerros filhos de mães imunes adquirem imunidade colostrar, que confere boa proteção por, aproximadamente, seis meses.

5.2.2.3 Diagnóstico e controle

A apresentação clínica da doença em animais de zonas endêmicas é altamente sugestiva da doença. Para a confirmação laboratorial, pode-se coletar material de lesões recentes e identificar inclusões intracitoplasmáticas pelo exame histológico. O material das crostas pode ser examinado na ME ou inoculado em cultivos de células de testículo de cordeiro. A confirmação da identidade do agente isolado deve ser realizada por IFA. Anticorpos específicos podem ser pesquisados por SN.

O diagnóstico diferencial deve considerar principalmente a infecção generalizada pelo BoHV-2 (*pseudo lumpy skin disease*) que, geralmente, é mais leve, causa lesões mais superficiais e apresenta um curso mais curto. A infecção pelo BoHV-2 também se caracteriza pela presença de inclusões intranucleares, em contraste com as inclusões citoplasmáticas observadas na LSD. Outras doenças que cursam com lesões em mucosas, como a peste bovina, infecção pelo BVDV e febre catarral maligna também devem ser consideradas.

Como o vírus é disseminado principalmente por insetos, medidas como quarentena e controle do trânsito de animais são geralmente pouco efetivas. Portanto, o controle baseia-se fundamentalmente na vacinação. Assim, vírus atenuados – tanto o LSDV como o vírus da varíola ovina ou caprina – têm sido utilizados na vacinação profilática dos rebanhos. A imunização com o vírus Neethling atenuado confere uma longa proteção após uma única aplicação, mas a reação inflamatória no local da vacinação pode ser severa e levar à redução temporária na produção de leite por vacas em lactação. Bezerros, filhos de vacas natural ou artificialmente imunizadas, não necessitam ser vacinados, mas aqueles nascidos de mães susceptíveis devem ser vacinados quando da ocorrência de surtos.

A vigilância sanitária com erradicação tem sido utilizada em países vizinhos às áreas endêmicas, e os bovinos que são introduzidos nessas áreas devem ser previamente imunizados.

5.3 Gênero *Suipoxvirus*

5.3.1 Vírus da varíola suína

A varíola suína (*swinepox*) é uma doença aguda, porém leve, que afeta principalmente suínos jovens e se caracteriza pela formação de pápulas, pústulas e crostas cutâneas. No passado, manifestações clínicas semelhantes foram observadas também durante a infecção de suínos com o vírus vaccinia, utilizado para imunizar pessoas contra a varíola. Após a erradicação da varíola do mundo e a interrupção da vacinação humana, essa doença tem sido atribuída somente ao poxvírus suíno.

O agente da varíola suína é o poxvírus suíno (*swinepoxvirus*), única espécie que compõe o gênero *Suipoxvirus*. Esse vírus possui morfologia semelhante aos ortopoxvírus, como o vírus da vaccinia, com o qual compartilha alguns determinantes antigênicos. Os vírions são altamente resistentes sob condições ambientais e podem resistir em escaras ou crostas por até um ano a temperatura ambiente. Os vírus de campo não replicam bem em cultivos celulares e a sua propagação exige adaptação prévia aos cultivos. O vírus não replica na membrana cório-alantóide de ovos embrionados. Assim como outros poxvírus de animais domésticos, esse vírus tem sido utilizado como vetor no desenvolvimento de vacinas para essa espécie.

5.3.1.1 Epidemiologia

O poxvírus suíno é específico dessa espécie, e a infecção é distribuída mundialmente. Durante a infecção aguda, o vírus é excretado pela saliva e em secreções conjuntivais dos animais infectados e também está presente nos fluidos das lesões. Crostas e escaras podem abrigar o vírus viável no ambiente durante meses. A transmissão do vírus pode ocorrer por contato direto ou indireto entre animais e também mecanicamente através de piolhos (*Hematopinus suis*). Os piolhos infectados podem abrigar o vírus infeccioso por até dois meses. Outros insetos hematófagos também podem

potencialmente transmitir o vírus mecanicamente. A transmissão transplacentária também pode ocorrer e resulta na produção de lesões na pele, língua e mucosa bucal de leitões recém-nascidos.

5.3.1.2 Patogenia e sinais clínicos

O vírus possui um tropismo marcante por células da epiderme e, em casos graves, pode também infectar células epiteliais do trato respiratório superior e digestivo. O período de incubação da doença é de quatro a 14 dias, e é seguido de doença branda com lesões geralmente restritas à pele. A doença afeta suínos de todas as idades, embora os animais jovens estejam mais predispostos. Febre baixa e breve pode preceder o desenvolvimento de pápulas, que, em um ou dois dias, tornam-se pústulas umbilicadas, que evoluem para crostas. As crostas normalmente caem por volta de uma semana, e a cicatrização se completa em três semanas. O estágio vesicular geralmente não é observado. As lesões podem ocorrer em qualquer local da superfície do corpo, embora sejam mais abundantes no abdome, na face interna das coxas e nas orelhas. A mortalidade é usualmente baixa, mas a morbidade em certos rebanhos pode ser muito alta e causar um sério retardo no crescimento da leitegada. Contaminação secundária das lesões por bactérias pode levar à formação de abscessos e, eventualmente, ocasionar certa mortalidade. Lesões extensas podem resultar do hábito dos animais se coçarem em objetos ou anteparos.

Os suínos recuperados podem desenvolver imunidade sólida, mesmo na ausência de anticorpos neutralizantes detectáveis, o que sugere que a imunidade celular ou humoral local sejam mais importantes para a proteção.

5.3.1.3 Diagnóstico e controle

As lesões na pele, associadas à infestação de piolhos, são sugestivas da enfermidade, mas a confirmação laboratorial é importante para descartar outras doenças vesiculares. O diagnóstico definitivo pode ser obtido por IFA, ME de raspados das lesões ou pelo isolamento do agente em cultivo de células de suínos.

Não existem vacinas disponíveis para a enfermidade, embora tentativas de imunização com vírus adaptado em cultivo celular tenham surtido resultados promissores. O controle da doença é geralmente obtido pela eliminação dos piolhos, associado com medidas de higiene e desinfecção de ambientes e instalações.

5.4 Gênero *Molluscipoxvirus*

5.4.1 Vírus do *Molluscum contagiosum*

A doença causada pelo vírus do *Molluscum contagiosum* é específica dos humanos, mas será abordada nesta seção por ser confundida com infecções zoonóticas causadas por outros poxvírus. A doença ocorre em crianças em todos os continentes, mas é mais comum em alguns países, como o Congo e Nova Guiné. Fontes de contágio bastante comuns são as piscinas coletivas e ginásios de esporte, e as crianças se infectam pelo contato direto com pequenas lesões nas mãos; a infecção de adultos ocorre freqüentemente pela via sexual.

A enfermidade é caracterizada por nódulos bem delimitados, com 2 a 5 mm de diâmetro, limitados à epiderme e que ocorrem em qualquer região do corpo, com exceção da palma das mãos e sola dos pés. Os nódulos não causam dor e podem levar vários meses até a recuperação completa.

5.5 Gênero *Yatapoxvirus*

5.5.1 Vírus yabapox e tanapox

Os vírus yabapox e tanapox infectam naturalmente humanos e macacos no Oeste da África. O vírus yabapox causa tumores grandes e benignos em áreas desprovidas de pêlos da face, nas palmas da mão e pés e nos espaços interdigitais, além das mucosas dos lábios, palato, narinas e sinus de macacos, embora possa infectar humanos em contato com os macacos doentes.

O vírus tanapox causa uma doença em humanos, provavelmente contraída pela picada de artrópodos, que adquirem o vírus de algum animal reservatório. As lesões iniciam como pápulas,

que progridem para vesículas, geralmente sem o aparecimento de pústulas. Também podem ocorrer febre, dor de cabeça e prostração.

5.6 Gênero *Avipoxvirus*

5.6.1 Vírus da bouba aviária

O vírus da varíola aviária também é muito conhecido como vírus da bouba aviária. As espécies virais classificadas dentro do gênero são específicas de aves e são antigenicamente relacionadas, embora possam ser diferenciadas pelo espectro de hospedeiros, por sorologia e pela formação diferencial de lesões em cultivos de células e na membrana corioalantóide de ovos embrionados. Os vários vírus deste gênero também apresentam patogenicidade diferente de acordo com as espécies de aves. Esses vírus têm sido isolados de todas as espécies de aves domésticas e silvestres e têm recebido denominação relacionada com os seus hospedeiros.

5.6.1.1 Epidemiologia

Os avipoxvírus são distribuídos mundialmente e as suas infecções têm sido descritas há séculos. Criações de galinhas, perus e pombos podem sofrer perdas consideráveis em algumas épocas do ano, geralmente relacionadas com a presença de um maior número de vetores transmissores do agente. O avipoxvírus de galinhas é altamente infeccioso para galinhas e perus, raramente para pombos e nada para os patos e canários. Já o poxvírus de perus é virulento para os patos.

5.6.1.2 Patogenia e sinais clínicos

A transmissão do vírus pode ocorrer por contato direto ou indireto, mas a transmissão mecânica por insetos é geralmente a mais importante. A transmissão mecânica por artrópodos é o provável mecanismo de transmissão e disseminação dos diferentes avipoxvírus para as diversas espécies de aves.

O período de incubação da enfermidade varia entre 4 e 10 dias para galinhas, perus e pombos. A doença pode ocorrer numa forma diftérica,

cutânea ou ambas. A forma cutânea é a mais comum nos surtos. As aves afetadas geralmente apresentam poucos sinais sistêmicos, como depressão, redução leve ou moderada do ganho de peso e produção de ovos. As lesões evoluem de pápulas para vesículas, pústulas e crostas, dependendo do momento da observação. As regiões desprovidas de penas são mais atingidas, principalmente a cabeça, pescoço, patas, pernas e ao redor da cloaca. Uma apresentação incomum das lesões em áreas emplumadas do corpo (dorso e coxas) teve grande repercussão econômica na região Sul do Brasil nos anos 1990.

A forma diftérica se caracteriza por lesões na parte superior do trato respiratório e digestivo, que podem resultar em dispnéia, inapetência, descarga nasal e ocular. As lesões nas mucosas caracterizam-se por placas salientes de coloração amarelada, principalmente na boca. Essas lesões geralmente acompanham as lesões cutâneas, mas podem ocorrer isoladamente em alguns indivíduos.

Resposta imunológica humoral e celular pode ser detectada após a recuperação da infecção, mas os anticorpos maternos não são capazes de proteger a progênie.

5.6.1.3 Diagnóstico e controle

As lesões cutâneas e diftéricas podem ser examinadas histologicamente e apresentam inclusões citoplasmáticas. O material coletado pode também ser submetido ao isolamento viral. O isolamento pode ser realizado pela inoculação do material em aves susceptíveis, por escarificação da crista ou punção da membrana da asa ou através de inoculação na membrana corio-alantóide de ovos embrionados de 9 a 12 dias. Em cultivos de células de aves, o vírus pode não produzir efeito citopático evidente em uma inoculação inicial.

O diagnóstico laboratorial é importante para diferenciá-la da laringotraqueíte infecciosa, micotoxicose T-2 e deficiência de biotina e ácido pantotênico.

Em regiões e épocas do ano mais propensas à ocorrência da doença, os pintos devem ser vacinados já no primeiro dia de vida, por via subcutânea, no incubatório, ou *in ovo* no 18º dia de incu-

bação. Para a imunização, podem ser utilizadas cepas virulentas de galinhas que são inoculadas no folículo da pena ou por escarificação da asa ou da perna. Os poxvírus de canários e de pombos são naturalmente atenuados para galinhas e também têm sido utilizados como vacina.

O controle da população de insetos nas épocas problemáticas também pode ser muito eficiente para diminuir a disseminação da doença durante um surto. O tratamento dos animais afetados com antibióticos também pode reduzir as infecções secundárias durante os surtos da doença.

5.7 Gênero *Leporipoxvirus*

5.7.1 Vírus do mixoma dos coelhos

O vírus do mixoma é o agente da mixomatose, que é uma doença generalizada e altamente fatal em coelhos europeus. A denominação da doença se deve ao edema subcutâneo gelatinoso que se desenvolve nos animais infectados. Em coelhos selvagens das Américas, o vírus causa fibromas benignos. O vírus do mixoma foi o primeiro vírus introduzido no meio ambiente com o objetivo de controlar uma população de animais, estratégia utilizada na Austrália para controlar a população de coelhos silvestres.

5.7.1.1 Epidemiologia

Os hospedeiros naturais do vírus são as espécies de coelhos das Américas, *Sylvilagus brasiliensis*, na América do Sul, e *S. bachmani* na América do Norte. Nesses hospedeiros, o vírus causa um fibroma cutâneo benigno. Contudo, nos coelhos da Europa (*Oryctolagus cuniculus*), o vírus causa uma doença generalizada que é geralmente fatal. Na década de 1950, o vírus foi introduzido na população de *O. cuniculus* da Europa, Chile e Austrália para o controle biológico dessas populações. Num primeiro momento, mais de 99% da população de coelhos infectados morria, e a doença tornou-se endêmica nessas regiões. Após um determinado período, foram detectadas cepas de vírus atenuadas, assim como populações de coelhos resistentes. Nos locais onde a doença ainda se manifesta, as epidemias ocorrem sazo-

nalmente todos os anos devido ao aumento da população de artrópodes vetores e à presença de muitos coelhos jovens susceptíveis.

5.7.1.2 Patogenia e sinais clínicos

A transmissão do agente pode ocorrer por secreções respiratórias, mas é mais comum através de artrópodos, como mosquitos, moscas, carrapatos, pulgas e piolhos. Esses artrópodos atuam como vetores mecânicos. O vírus replica nos tecidos próximos à picada do inseto e nos linfonodos regionais. A viremia que se segue está associada às células, principalmente aos linfócitos. O edema gelatinoso, que é mais evidente na cabeça e ao redor da área anogenital, e a blefarconjuntivite, com secreção ocular opalescente, dão aos animais uma aparência leonina. Os coelhos infectados ficam febris e muito apáticos, alguns podendo morrer em menos de 48 horas. A maioria dos animais infectados, no entanto, morre em até 12 dias. A progressão e morte rápida pela doença são mais comuns com isolados da Califórnia. Nos coelhos que sobrevivem por mais tempo, o edema subcutâneo ocorre em todo o corpo dentro de 2 a 3 dias. A presença do vírus pode ativar a infecção por *Pasteurella multocida*, resultando em secreção nasal. Temperaturas baixas também podem aumentar a severidade da doença. A mortalidade que varia entre 25 e 90% é influenciada tanto pela virulência da cepa de campo quanto pela resistência genética da população de coelhos.

5.7.1.3 Diagnóstico e controle

O diagnóstico de mixomatose em coelhos europeus pode ser feito pelas manifestações clínicas. O isolamento do vírus ou a detecção de um poxvírus indistinguível do VV no exsudato ou lesões confirma o diagnóstico. O isolamento pode ser feito por inoculação de coelhos, inoculação na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha ou em cultivos de células de coelhos ou galinhas.

A proteção dos coelhos de laboratório ou de criações comerciais pode ser obtida utilizando-se uma vacina viva com uma cepa do vírus do mixoma atenuado ou com o vírus do fibroma dos

coelhos, um vírus relacionado aos *Leporipoxvirus*. A redução das populações de artrópodes vetores ou o impedimento de sua entrada nos criatórios também auxilia no controle da doença em áreas endêmicas.

5.8 Gênero *Parapoxvirus*

Os três parapoxvírus mais importantes em veterinária são: o vírus do ectima contagioso dos ovinos (orf); o vírus da pseudovariola bovina e o vírus da estomatite papular bovina. Esses vírus também infectam várias espécies de animais terrestres e aquáticos. As lesões causadas pelos parapoxvírus tendem a ser localizadas e proliferativas. As lesões causadas pelas três espécies virais são indistinguíveis e se iniciam com pápulas, que aumentam e se tornam granulosas e crostosas, podendo persistir por várias semanas antes de regredir. Essas três espécies virais são potencialmente zoonóticas e podem afetar pessoas que possuem contato com os animais, como criadores, ordenhadores e veterinários. As lesões nas pessoas se desenvolvem com maior frequência nas mãos e são geralmente localizadas e autolimitantes.

Os parapoxvírus possuem vírions com morfologia que difere dos outros gêneros de poxvírus, apresentando proteínas tubulares organizadas de forma cruzada na superfície do vírion (ver Figura 18.2). Essa característica possui utilidade para o seu diagnóstico, pois permite diferenciação de outros poxvírus através da ME.

5.8.1 Vírus do ectima contagioso

O vírus do ectima contagioso, ou vírus da orf (OrfV) é o agente etiológico do ectima contagioso dos ovinos e caprinos, também chamado de boca sarnenta, dermatite pustular contagiosa de ovinos, estomatite pustular contagiosa, dermatite labial infecciosa e orf. A palavra *orf* é derivada de uma expressão inglesa antiga para rugoso (*rough*). Em algumas regiões do Brasil, a doença em ovinos é denominada *boqueira*. O ectima contagioso é uma enfermidade exantematosa vesicular e pustular localizada que afeta ovinos, caprinos e outros pequenos ruminantes. A enfermidade tem distribuição mundial.

O OrfV se multiplica em cultivos primários ou linhagens celulares de ovinos, bovinos e humanos, mas não replica na membrana cório-alantóide de ovos embrionados. Isolados de campo apresentam considerável variabilidade genética, que pode ser evidenciada por análise de restrição enzimática do genoma. No entanto, essa variabilidade genética não se reflete em diferenças antigênicas detectáveis por testes de SN, ou seja, os diferentes isolados são antígenicamente relacionados e apresentam reatividade sorológica cruzada.

5.8.1.1 Epidemiologia

O vírus ocorre em todas as regiões do mundo onde existem criações de ovinos e caprinos e é mantido nas populações por infecções persistentes e também pela sua longa sobrevivência em crostas secas no ambiente. O vírus pode permanecer viável em crostas secas nas pastagens durante vários meses e até anos. A disseminação da doença pode ocorrer por contato direto ou indireto por fômites e, principalmente, por pastagens contaminadas. Além das pastagens, as instalações, estábulos e utensílios podem abrigar o vírus viável por longo tempo e servir de veículo para a sua transmissão. Forragens abrasivas contaminadas com o vírus facilitam a instalação da infecção e podem resultar em infecção disseminada. Cordeiros também podem adquirir a infecção ao mamar nas ovelhas com lesões nas tetas. Em criações intensivas, a infecção se dissemina rapidamente, principalmente em confinamentos de cordeiros para engorda.

A enfermidade afeta animais de todas as idades, mas é mais grave em cordeiros lactentes que perdem peso e podem até morrer de inanição por não se alimentarem devido às lesões nas comissuras orais. Condições deficientes de higiene, deficiência de vitamina A, estresse e outras condições que causem imunodepressão predisõem à ocorrência de surtos severos. Infecções subclínicas provavelmente também ocorram.

As taxas de morbidade após a introdução do agente em rebanhos livres podem atingir 100%, mas a mortalidade é geralmente baixa e deve-se principalmente a complicações secundárias e à inanição em cordeiros jovens.

O vírus também pode infectar espécies silvestres que compartilham pastagens com caprinos e ovinos afetados e, ocasionalmente, cães e humanos envolvidos na criação dessas espécies podem também ser infectados.

5.8.1.2 Patogenia e sinais clínicos

O vírus geralmente penetra pela pele ou junção mucocutânea dos lábios e focinho, pelo contato direto entre animais ou pelo contato e lesões causadas por pastagens abrasivas. O período de incubação varia entre dois e seis dias. A doença é caracterizada por lesões nos lábios e focinho, mas pode afetar a boca e língua, principalmente em cordeiros jovens, além das áreas interdigitais, genitália e úbere. As pápulas e vesículas progridem rapidamente para pústulas e posterior formação de crostas. As lesões crostosas são salientes na pele e, freqüentemente, apresentam rachaduras e sangramento, podendo predispor a contaminações secundárias e miíases. Traumas leves também podem fazer as crostas caírem e as lesões sangrarem. As lesões nos lábios levam à redução da ingestão de pasto ou amamentação, o que leva à perda progressiva de peso. As perdas também podem decorrer do desenvolvimento de infecções bacterianas e parasitárias (miíases) nas lesões. Nos casos não complicados, o curso da doença dura alguns dias e é seguido da resolução das lesões. A duração da doença no rebanho, no entanto, pode se estender por semanas e até meses, pela infecção gradativa e sequencial de outros animais suscetíveis.

Na forma genital, as lesões podem ocorrer no escroto, prepúcio e pênis ou na mucosa vulvar e no períneo. Lesões também ocorrem com freqüência no úbere e nas tetas, o que faz com que as ovelhas evitem a mamada dos cordeiros.

A forma generalizada, que não é muito comum, é geralmente fatal e caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões típicas generalizadas na pele e nas mucosas da boca, faringe e esôfago. Uma pleuropneumonia supurativa, devido a contaminações bacterianas secundárias, termina agravando o quadro e é uma das principais responsáveis pela mortalidade.

5.8.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo baseia-se nos dados clínicos e epidemiológicos. As lesões crostosas são típicas, inicialmente afetam poucos animais e rapidamente se disseminam para todos os animais jovens que nunca foram infectados ou vacinados. Em rebanhos virgens, a enfermidade se alastra e infecta animais de todas as idades. Ao exame microscópico, podem ser observadas células em forma de balão e corpúsculos de inclusão do tipo B nas lesões epiteliais.

O diagnóstico clínico, aliado ao histórico e informações epidemiológicas, é, geralmente, suficiente para definir a etiologia da doença. No entanto, o vírus pode ser identificado por ME a partir de crostas coletadas dos animais doentes. O vírus pode também ser isolado em células cutâneas ou de testículo de embrião ovino. Na prática clínica, o diagnóstico é geralmente clínico, podendo ser acompanhado de confirmação por ME.

5.8.1.4 Controle e profilaxia

Em áreas endêmicas, o controle baseia-se na vacinação maciça dos rebanhos, utilizando-se o vírus virulento coletado de lesões ou multiplicado em cultivos celulares. No Brasil, a vacina disponível foi produzida pela escarificação cutânea e inoculação do vírus nas lesões. A vacinação é realizada pela deposição de gotas da vacina em escarificações da pele, produzidas com objetos pontiagudos (agulhas hipodérmicas) em áreas do corpo que não resultem em lesões importantes e que não permitam a lambedura, como as axilas e as faces internas das coxas. A vacinação das ovelhas antes do período de nascimento dos cordeiros diminui o risco de uma epidemia.

A ocorrência de infecções crônicas, a possibilidade de ovinos previamente expostos se reinfectarem e a longa permanência do vírus viável no ambiente tornam difícil a erradicação da doença uma vez estabelecida no rebanho.

Em casos de surtos, os animais afetados devem ser separados dos demais e mantidos sob observação para evitar complicações bacterianas

ou parasitárias. Tratamento tópico das lesões e administração de vitamina A, além de antibioticoterapia, para evitar contaminações secundárias, também são indicados. Quando possível, os animais não afetados devem ser mudados de potreiro, evitando o pastoreio em pastagens altamente contaminadas. O fornecimento de alimento macio e palatável pode favorecer a continuidade da alimentação e a recuperação dos animais afetados.

Rebanhos livres devem investir na prevenção da introdução do agente, através de quarentena de animais eventualmente introduzidos na propriedade.

5.8.2 Vírus da pseudovariola bovina

A pseudovariola bovina (*pseudocowpox*) ocorre em todo o mundo, mas possui pouca importância sanitária e econômica na maioria dos países onde ocorre. É uma doença branda e comum de bovinos, que afeta principalmente vacas em lactação. Na Inglaterra, a prevalência de rebanhos que já apresentaram casos é alta; na África do Sul, a doença tem sido implicada em perdas importantes para rebanhos leiteiros, principalmente pela redução na produção de leite. Neste país, a doença tem sido associada a condições precárias de higiene e manejo de gado leiteiro.

O vírus da pseudovariola (um parapoxvírus) é muito semelhante – e possivelmente trata-se da mesma espécie de vírus – ao agente da estomatite papular bovina e apresenta alguma relação também com o vírus do ectima contagioso dos ovinos. O vírus replica em células de cultivo derivadas de bovinos e ovinos, mas não na membrana cório-alantóide de ovos embrionados.

O agente é geralmente introduzido nos rebanhos pela introdução de animais infectados. Uma vez introduzida, a infecção se dissemina lentamente entre os animais do rebanho leiteiro, por contato direto ou indireto. A transmissão ocorre frequentemente pelos bezerros, quando estão se amamentando, ou por moscas, além dos equipamentos de ordenha e mãos do ordenhador. Como foi mencionado, a transmissão do agente e a sua disseminação no rebanho estão diretamente liga-

das a condições inadequadas de higiene e manejo da ordenha.

O período de incubação situa-se ao redor de seis dias, após o qual aparecem lesões eritematosas nas tetas. As lesões evoluem para pápulas com um centro umbilicado e, posteriormente, para crostas abundantes, seguidas de descamação. Vesículas e pústulas recobertas com crostas também são comuns, resultando em crostas com aspecto típico, com a forma de anel ou ferradura. As crostas geralmente são descamadas em poucos dias, mas podem também durar por semanas. Contaminações bacterianas secundárias podem agravar o quadro da infecção aguda e retardar a resolução, o que pode acarretar em queda importante na produção de leite do rebanho. Lesões semelhantes podem ocorrer no focinho de bezerros que estão mamando nas vacas afetadas. A imunidade gerada pela infecção tem curta duração, e infecções recidivantes (mais comuns) ou crônicas (ocasionais) podem ocorrer.

O vírus pode ser transmitido e infectar humanos por contato direto, resultando no chamado nódulo do ordenhador (*milker's nodule*). Além das lesões locais (mãos), a fase aguda da doença em humanos pode incluir febre e infartamento dos linfonodos regionais. A enfermidade humana é geralmente leve, benigna e se resolve em poucos dias.

O diagnóstico indicado é a microscopia eletrônica sob coloração negativa de material coletado a partir das lesões (vesículas ou crostas), em que partículas víricas típicas podem ser visualizadas. O isolamento viral pode ser tentado, mas geralmente requer vários dias. Testes sorológicos não são indicados para o diagnóstico e não têm sido mais utilizados. O diagnóstico diferencial deve incluir a variola bovina (*cowpox*), doença de *lumpy skin* e mamilite herpética (BoHV-2).

O controle deve ser realizado mediante medidas de higiene adequadas de ordenha, que devem incluir o mergulho dos tetos em desinfetantes apropriados. O isolamento dos animais afetados e o manejo separado da ordenha podem reduzir a circulação do vírus entre os animais. Não existem vacinas disponíveis contra essa enfermidade.

5.8.3 Vírus da estomatite papular bovina

A estomatite papular bovina é uma doença de importância limitada em condições normais de manejo de gado leiteiro. A enfermidade ocorre em todo o mundo e parece estar limitada à espécie bovina, embora os humanos possam ser eventualmente infectados. A incidência maior ocorre em bovinos com idade inferior a dois anos, porém pode acometer animais de todas as idades. Tem sido sugerido que o vírus possa estabelecer infecções latentes e, assim, permanecer nos seus hospedeiros por longo tempo. A doença se caracteriza pela produção de exantemas papulares no focinho, lábios e gengivas, e é, geralmente, localizada e benigna.

O parapoxvírus causador da enfermidade pode ser propagado em cultivos celulares de origem humana, bovina e ovina, porém não replica em ovos embrionados de galinha ou em animais de laboratório.

O vírus é excretado pelas secreções nasais e orais, e a transmissão provavelmente ocorra por contato direto ou indireto. O período de incubação é geralmente de três a cinco dias. A doença é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões similares à pseudovariola bovina nos lábios, papilas bucais, coxim dental, palato mole e duro, língua, focinho e narinas. Pápulas hiperêmicas, com necrose na área central e anéis coloridos concêntricos, são lesões características. A doença é geralmente localizada e não há evidências de envolvimento sistêmico. A maioria dos casos clínicos é observada na primavera e início do verão. A taxa de morbidade, após a introdução do agente em um rebanho susceptível, pode atingir 100%. O estresse ou outras situações de imunodepressão parecem precipitar a enfermidade em animais susceptíveis. Por isso a doença pertence ao complexo de doenças associadas ao estresse e à aglomeração de animais (*crowding syndrome complex*).

Embora o vírus possa ser isolado em cultivo celular, o diagnóstico laboratorial de eleição é a ME em material obtido das crostas ou em raspados das lesões. Testes sorológicos não são utilizados.

Doenças que cursem com estomatite em bovinos, como a infecção pelos vírus da febre aftosa (FMDV), da diarreia viral bovina (BVDV) e peste bovina (RPV) devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.

O controle da doença é feito por medidas de higiene adequadas para evitar a propagação do agente. Não existem vacinas comerciais disponíveis. Recentemente, uma vacina heteróloga, baseada no agente do ectima contagioso dos ovinos, foi desenvolvida, mas não há consenso com relação a sua eficácia.

6 Os poxvírus como vetores de expressão

A primeira descrição do uso do VV, como vetor, ocorreu em 1982, e, desde então, os poxvírus têm se tornado vetores de expressão muito utilizados. A sua utilização pode ser feita com o fim de estudar a biologia molecular dos poxvírus, produzir e caracterizar a função de proteínas e, principalmente, na produção de vacinas replicativas. Várias características tornam os poxvírus recombinantes excelentes candidatos para esta última finalidade: a) a estabilidade da vacina liofilizada; b) o seu baixo custo, facilidade de produção e administração; c) a sua capacidade de induzir resposta imune humoral e celular contra os antígenos cujos genes foram inseridos no genoma; d) a sua utilização permite a discriminação da resposta vacinal da induzida pela infecção natural, já que somente alguns antígenos do patógeno de interesse são expressos; e) a possibilidade de deletar grandes porções de seu genoma e inserir vários genes exógenos, o que permite a produção de vacinas multivalentes.

Resumidamente, a estratégia de uso de poxvírus como vetores de expressão consiste na introdução de genes heterólogos no genoma desses vírus. A infecção dos poxvírus recombinantes *in vitro* (cultivos celulares) ou *in vivo* (em animais) resulta na expressão das proteínas de interesse cujos genes foram introduzidos no genoma. O uso dessa estratégia em vacinas é muito interessante, pois genes de proteínas de outros vírus de interesse podem ser incorporados ao genoma dos

poxvírus e, assim, obtém-se uma vacina viral que expressa antígenos de diferentes vírus.

Como fator indesejável, deve-se considerar que, dentro de um determinado gênero da família *Poxviridae*, existe uma relação antigênica estreita que pode resultar em proteção cruzada entre diferentes espécies de vírus. Dessa forma, a existência de imunidade contra o vírus selvagem que deu origem ao vetor pode reduzir o sucesso da vacinação com o vírus recombinante. Algumas estratégias que utilizam diferentes combinações de vetores e rotas de imunização têm sido utilizadas para evitar esse problema.

Para ser utilizados como vetores, as cepas virais candidatas devem ser atenuadas de forma a não causar doença no hospedeiro. Essa atenuação tem sido obtida pela passagem sucessiva do vírus em hospedeiros heterólogos, pela deleção de genes envolvidos na patogenicidade e pela inserção de genes que aumentem a resposta imune ao vetor.

Vários poxvírus, como o VV, podem infectar um grande número de espécies animais. Se isso representa uma vantagem, pois permite o seu uso como vacina em várias espécies, pode também se constituir em uma restrição. Dessa forma, deve ser determinado o risco da infecção e os seus possíveis efeitos em outras espécies que podem ser, acidentalmente, infectadas após a liberação de um poxvírus recombinante no meio ambiente ou pela disseminação do vírus recombinante a partir de um animal vacinado.

Vários vetores derivados dos poxvírus de suíno, ovino, caprino e parapoxvírus foram descritos e experimentalmente testados. A primeira vacina de poxvírus recombinante utilizada foi o VV, contendo o gene da glicoproteína G do vírus da raiva (RabV). Este vetor foi construído a partir da inserção do cDNA da gG do RabV no local do gene da timidina quinase da cepa Copenhagen do VV. Essa vacina foi utilizada para a imunização oral de raposas e outros carnívoros de vida livre contra a raiva, a partir de 1987, na Bélgica, e propiciou o controle e até mesmo a erradicação desta doença de vários países europeus.

Um avanço importante na utilização dos poxvírus como vetores vacinais foi obtido quando se

demonstrou que os avipoxvírus poderiam servir de vetores eficazes e seguros de vacinas para mamíferos. A sua multiplicação natural é restrita às aves, contudo, a sua inoculação em células de mamíferos resultou na expressão de genes inseridos no seu genoma e a inoculação em mamíferos induziu uma imunidade protetora. Essa imunização na ausência de replicação produtiva eliminou a possibilidade de disseminação do vetor a partir do animal vacinado para os contatos ou meio ambiente. Além disso, a utilização deste vetor em espécies que não são reservatórios dos avipoxvírus torna improvável a ocorrência de recombinação que altere a patogenicidade do vetor. A outra grande vantagem da utilização dos avipoxvírus como vetores é a possibilidade de aplicação em animais com imunidade prévia contra o VV.

Na última década, houve um grande número de relatos da utilização de uma cepa de poxvírus de canário (*canaripox*) atenuada recombinante em animais e humanos, ficando bem determinada a sua segurança e eficácia na indução de proteção. Uma vacina experimental contra o vírus da AIDS (HIV) foi produzida pela inserção do gene da gp160 no genoma desse poxvírus. Várias vacinas de uso veterinário, baseadas no poxvírus do canário, estão disponíveis comercialmente no Brasil e em outros países. Dentre estas se incluem: a) vacina contra o vírus da cinomose canina (CDV), na qual o poxvírus vetor contém os genes das glicoproteínas H e F; b) vacina contra o vírus da leucemia felina (FeLV), em que o vírus vetor contém o gene da glicoproteína de superfície do FeLV; c) vacina contra o vírus do Nilo Ocidental (WNV) para uso em eqüinos, no qual o gene da principal glicoproteína de superfície do WNV foi inserido no genoma do vírus vetor. Essa estratégia é tão promissora e o desenvolvimento das vacinas é tão ágil, que se pode antecipar que o número de vacinas animais, utilizando o poxvírus do canário como vetor, ampliar-se-á significativamente nos próximos anos. Pode-se especular também que a utilização criteriosa de poxvírus recombinantes, como vetores vacinais, propiciará a prevenção, erradicação e cura de algumas doenças que causam impacto na saúde animal.

7 Bibliografia consultada

- ARLEN, P.M.; KAUFMAN, H.L.; DiPAOLA, R.S. Pox Viral Vaccine Approaches. **Seminars in Oncology**, v.32, p.549-555, 2005.
- BARNARD, B.J.H. et al. Lumpy skin disease. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Oxford: Oxford University Press, 1994. Cap.52, p.604-612.
- BERNARDINO, A. Bouda Aviária. In: MACARI, M.; BERCHIERI JR, A. **Doenças das aves**. Campinas, SP: FACTA, 2000. p.333-338.
- BEUKEMA, E.L.; BROWN, M.P.; HAYBALL, J.D. The potential role of fowlpox virus in rational vaccine design. **Expert Review of Vaccines**, v.5, p.565-577, 2006.
- BULLER, R.M.; PALUMBO, G.J. Poxvirus pathogenesis. **Microbiological Reviews**, v.55, p.80-122, 1991.
- CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic virology: a practitioner's guide**. St. Louis, MO: Mosby, 1992. 285p.
- DAMON, I.K. Poxviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds). **Fields virology**. 5.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap.75, p.2947-2975.
- FENNER, F.; BULLER, R.M.L. Mousepox. In: NATHANSON, N. (Ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.22, p.535-553.
- GHERARDI, M.M.; ESTEBAN, M. Mucosal and systemic immune responses induced after oral delivery of vaccinia virus recombinants. **Vaccine**, v.17, p.1074-1083, 1999.
- GHERARDI, M.M.; ESTEBAN, M. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. **The Journal of General Virology**, v.86, p.2925-2936, 2005.
- HAGA, I.R.; BOWIE, A.G. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. **Parasitology**, v.130, p.S11-25, 2005.
- HAIG, D.M.; MERCER, A.A. Ovine Diseases. Orf. **Veterinary Research**, v.29, p.311-326, 1998.
- HOUSE, J.A.; HOUSE, C.A. Swine Pox. In: STRAW, B.E. et al. (Eds). **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999. Cap.23, p.291-294.
- HUGHES, A.L.; FRIEDMAN, R. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.35, p.186-195, 2005.
- KERR, P.J.; JACKSON, R.J. Myxoma virus as a vaccine vector for rabbits: antibody levels to influenza virus haemagglutinin presented by a recombinant myxoma virus. **Vaccine**, v.13, p.1722-1726, 1995.
- LEFKOWITZ, E.J.; WANG, C.; UPTON, C. Poxviruses: past, present and future. **Virus Research**, v.117, p.105-118, 2006.
- McFADDEN, G. Poxvirus tropism. **Nature Reviews. Microbiology**, v.3, p.201-213, 2005.
- MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds). **Fields virology**. 5.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap.74, p.2905-2945.
- MUNZ, E.; DUMBELL, K. Orf. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Oxford: Oxford University Press, 1994. Cap.54, p.616-620.
- MUNZ, E.; DUMBELL, K. Sheeppox and goatpox. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Oxford: Oxford University Press, 1994. Cap.53, p.613-615.
- MURPHY, F.A. et al. Poxviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. Cap.16, p.277-291.
- PASTORET, P.P.; BROCHIER, B. The development and use of vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies: a link between Jenner and Pasteur. **Epidemiology and Infection**, v.116, p.235-240, 1996.
- PASTORET, P.P.; VANDERPLASSCHEN, A. Poxviruses as vaccine vectors. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.26, p.343-355, 2003.
- PATTYN, S.R. Monkeypoxvirus infections. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.19, p.92-97, 2000.
- QUINN, P.J. et al. (Eds). Poxviridae. In: _____. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.327-334.
- STOTT, J.L. Poxviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology**. Malden, MA: Blackwell Science Inc., 1999. Cap.64, p.365-370.
- TAYLOR, J. et al. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. **Vaccine**, v.9, p.190-193, 1991.
- TRIPATHY, D.N. Swinepox virus as a vaccine vector for swine pathogens. **Advances in Veterinary Medicine**, v.41, p.463-480.
- TRIPATHY, D.N. The impact of vaccines and the future of genetically modified poxvirus vaccines for poultry. **Animal Health Research Reviews**, v.5, p.263-266, 2004.
- YERUHAM, I.; ABRAHAM, A.; NYSKA, A. Clinical and pathological description of a chronic form of bovine papular stomatitis. **Journal of Comparative Pathology**, v.11, p.279-286, 1994.

1 Introdução	515
2 Classificação	515
3 Propriedades dos vírions, estrutura e organização genômica	515
4 Replicação	517
4.1 Adsorção	517
4.2 Penetração	517
4.3 Expressão gênica	517
4.3.1 Transcrição	517
4.3.2 Síntese e modificação das proteínas	518
4.4 Replicação do DNA viral	518
4.5 Morfogênese	519
5 Vírus da peste suína africana	520
5.1 Epidemiologia	520
5.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	521
5.2.1 A infecção nos carrapatos	523
5.3 Imunidade	523
5.4 Diagnóstico	523
5.5 Controle e profilaxia	524
6 Bibliografia consultada	524

¹ Tradução: Fernanda Silveira Flores Vogel

1 Introdução

A família *Asfarviridae* é constituída por apenas uma espécie viral, o vírus da peste suína africana (ASFV), origem da sua denominação. O ASFV é um vírus DNA envelopado, grande e complexo, que compartilha vários aspectos da estrutura do genoma e estratégia de replicação com os poxvírus. A replicação do ASFV ocorre no citoplasma das células hospedeiras, em sítios perinucleares bem definidos, denominados fábricas de vírus. Esse vírus exibe uma regulação temporal da expressão gênica e apresenta a estrutura do genoma similar aos poxvírus, incluindo as seqüências repetidas invertidas terminais, uma região central conservada e regiões variáveis nos segmentos terminais do genoma.

O ASFV é o agente etiológico da peste suína africana (ASF), uma enfermidade severa e muito importante de suínos, principalmente no continente africano. A ASF tem sido observada desde os primórdios do século 20 no sul e no leste da África e inicialmente era caracterizada pelos aspectos clínico-patológicos semelhantes aos da peste suína clássica (CSF). No entanto, foi observado, posteriormente, que essas duas enfermidades são muito diferentes. Na segunda metade do século 20, a ASF foi detectada no sul e oeste da Europa e posteriormente em Cuba, República Dominicana, Haiti e Brasil. Atualmente, a ASF está erradicada da maioria dos países, mas permanece enzootica na África subsaariana.

Na África, o ASFV se mantém em ciclos selváticos com infecção de suídeos selvagens e de carrapatos do gênero *Ornithodoros*. A capacidade de infectar carrapatos faz do ASFV o único arbovírus entre os vírus DNA. Os suídeos selvagens infectados com o ASFV geralmente são assintomáticos e apresentam baixos níveis de viremia. Por outro lado, a infecção de suínos domésticos resulta em conseqüências diversas manifestações clínicas, que vão desde infecções subclínicas até doença altamente fatal.

2 Classificação

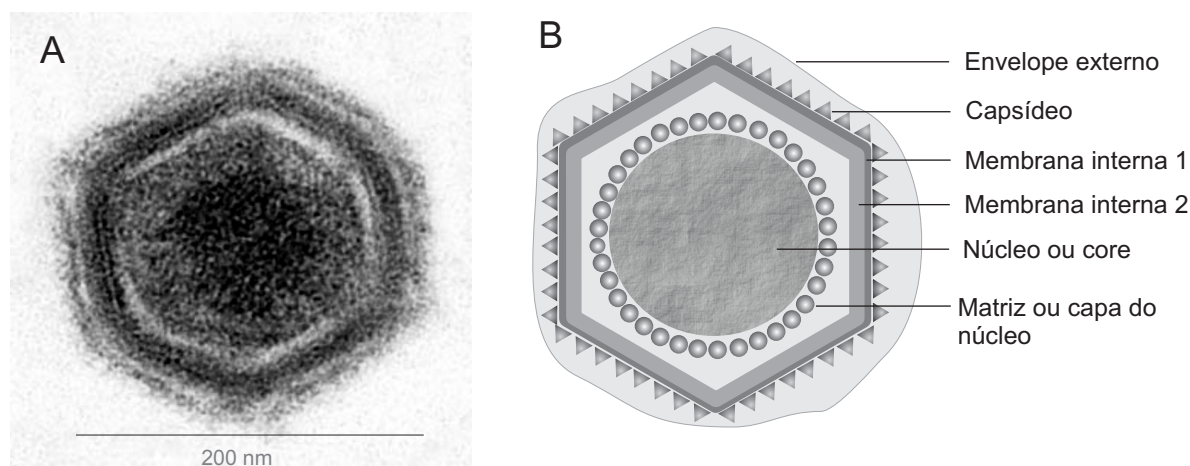
O ASFV é o único membro no gênero *Asfivirus* e também da família *Asfarviridae*, uma famí-

lia recentemente estabelecida: *Asfarviridae* (*Asfar*, *african swine virus* e vírus relacionados). Como anteriormente citado, os vírus desta família apresentam características semelhantes às de outros vírus DNA grandes que replicam no citoplasma, incluindo os membros das famílias *Poxviridae*, *Iridoviridae* e *Phycodnaviridae*. A replicação desses vírus é relativamente independente da maquinaria de transcrição da célula hospedeira.

A análise genômica por restrição enzimática permitiu a classificação do ASFV em cinco tipos principais. Os vírus isolados nas Américas e Europa pertencem ao mesmo grupo genético, enquanto os isolados africanos apresentam uma variação maior, provavelmente pelo maior tempo de evolução e divergência genética. Os isolados de campo do ASFV apresentam diferentes níveis de virulência em suínos.

3 Propriedades dos vírions, estrutura e organização genômica

Os vírions do ASFV são envelopados e possuem entre 175 e 215 nm de diâmetro. As partículas víricas são constituídas por mais de 50 polipeptídeos e apresentam uma estrutura complexa, mas regular, quando observados sob microscopia eletrônica (Figura 19.1). Os vírions possuem simetria icosaédrica e apresentam várias camadas concêntricas, resultando em um diâmetro de aproximadamente 200 nm. O *core* (ou núcleo) possui 80 nm e é composto por uma estrutura nucleoprotéica eletrodensa envolta por uma camada protéica espessa, chamada de capa do núcleo ou matriz. Estima-se que um terço da massa protéica dos vírions esteja presente na matriz. Envolvendo esta estrutura central (*core* + matriz), existe uma membrana lipídica dupla, originalmente denominada membrana interna. Essa membrana é provavelmente derivada de cisternas do retículo endoplasmático (RE). Externamente à membrana interna, está localizado o capsídeo, que é composto por múltiplas cópias da proteína estrutural p72 (também referida como p73). Essa estrutura contém um terço da massa protéica dos vírions e determina a estrutura icosaédrica do vírion. Os capsômeros do ASFV são arranjados de forma hexagonal, possuem 13 nm de diâmetro



Fonte: A) Dra Sharon Brookes, IAH, Pirbright, UK (ICTVdB).

Figura 19.1. Vírions da família *Asfarviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica de um vírion do ASFV; B) Ilustração esquemática de um vírion e seus componentes.

e apresentam uma cavidade central. O número de triangulação do ASFV tem sido estimado em $T=189$ a $T=127$, sugerindo que entre 1.892 e 2.172 capsômeros formam o capsídeo. Revestindo externamente o capsídeo existe uma membrana lipídica adquirida pelo brotamento do vírus na membrana plasmática, mas que não é necessária para a infectividade viral.

O genoma do ASFV é constituído por uma molécula de DNA de fita dupla de aproximadamente 190 kb, com regiões terminais repetidas e invertidas que contêm estruturas secundárias (*hairpin-loops*) próximas às extremidades. Próximo aos *hairpins* terminais são encontradas seqüências semelhantes àquelas envolvidas na resolução dos concatêmeros durante a replicação do genoma dos poxvírus. A região central de 125 kbp do genoma contém genes conservados entre os diferentes isolados, enquanto as regiões terminais são variáveis, possuindo genes com diferentes composições e números de cópias entre isolados. Nessas regiões estão presentes os genes pertencentes a famílias multigênicas, que são importantes para a determinação do espectro de hospedeiros e da virulência.

O genoma do ASFV codifica cerca de 150 proteínas, indicando a complexidade estrutural e biológica deste vírus. A maioria dessas proteínas

é codificada pela região mais conservada do genoma. Entre essas, estão as proteínas de membrana e outras proteínas estruturais, além de proteínas recentemente envolvidas nas diversas etapas de morfogênese das partículas víricas.

Outras proteínas do ASFV apresentam seqüências similares a proteínas ou enzimas celulares, incluindo aquelas que participam do metabolismo de nucleotídeos, da replicação e reparo do DNA, da transcrição e da modificação de proteínas, e também as proteínas requeridas para atividades enzimáticas que estão presentes nos vírions ou são induzidas em células infectadas.

O ASFV também codifica proteínas que medeiam as interações vírus-célula hospedeira, determinam a virulência e interferem em mecanismos que favorecem a replicação viral na célula hospedeira, incluindo homólogos dos inibidores de apoptose celulares (IAP), Bcl-2, IκB, proteínas semelhantes à lecitina e proteínas CD2. Notavelmente, várias proteínas que influenciam na virulência e no espectro de hospedeiros estão entre as mais variáveis entre os isolados do ASFV.

Os vírions do ASFV são estáveis sob condições ambientais, resistindo a amplas variações de temperatura e pH. O vírus preserva a viabilidade após seis meses em embutidos, ou após anos em carnes congeladas, indicando que os subprodu-

tos de suínos podem ser importantes meios de disseminação de vírus. Os vírions intactos são muito sensíveis a solventes lipídicos, detergentes e agentes oxidantes, como o hipoclorito. Em condições de laboratório, o armazenamento de tecidos infectados a -20°C não é recomendado, enquanto a -70°C a infectividade é mantida por tempo indeterminado.

4 Replicação

O vírus é capaz de replicar em uma variedade de células de origem suína e pode também ser adaptado para multiplicar em linhagens celulares de outras espécies. Grande parte dos conhecimentos sobre a biologia do ASFV foi adquirida a partir de estudos sobre a sua replicação em cultivos celulares.

4.1 Adsorção

Várias proteínas virais se ligam a componentes da superfície da célula hospedeira, incluindo a proteína conservada p12 (p061R), a proteína estrutural p54, e a proteína de membrana p30 (também chamada de p32 e de pCP204L). Evidências sugerem a participação da p72 e p54 na ligação do vírus com a membrana celular, e da p30 na internalização do vírion. No entanto, anticorpos neutralizantes contra essas proteínas não são suficientes para conferir proteção em camundongos. Embora a identidade dos receptores que medeiam a adsorção e penetração do ASFV não seja conhecida, moléculas potencialmente envolvidas no papel de receptor têm sido detectadas na superfície de macrófagos suínos.

4.2 Penetração

A internalização do ASFV nas células é independente de temperatura e de energia, mas é um processo dependente de redução do pH, o que sugere o mecanismo de endocitose mediada por receptor. Neste caso, a fusão do envelope do ASFV com a membrana celular ocorreria nos endossomos. Tem sido sugerido que os núcleos dos vírions seriam transportados no sentido retrógrado ao longo dos microtúbulos até os sítios de

morfogênese viral, que se localizam próximo ao centro de organização dos microtúbulos. De fato, a ruptura dos microtúbulos induzida por drogas inibe a síntese de DNA viral, o acúmulo e proteínas e a replicação do genoma, indicando que o transporte ao longo dos microtúbulos é importante nas etapas iniciais da replicação do ASFV.

4.3 Expressão gênica

4.3.1 Transcrição

Os vírions do ASFV contêm a RNA polimerase dependente de DNA, sugerindo que a transcrição e síntese de RNAs mensageiros (mRNA) se inicia imediatamente após a penetração, independente de enzimas e fatores celulares. A expressão gênica do ASFV, semelhante a dos poxvírus, consiste de uma transcrição inicial de genes virais específicos e de uma fase tardia de transcrição. Essa fase tardia é dependente de síntese protéica prévia e do início da replicação do DNA.

A expressão dos genes iniciais pode ser detectada já duas horas após a infecção (pi), com o pico da síntese ocorrendo entre 4 e 8 horas pi. Os transcritos iniciais possuem uma pequena sequência líder não-traduzida na região 5' e possuem extremidades 3' distintas. A expressão dos genes tardios é totalmente dependente da replicação do DNA viral e atinge o pico entre 12 a 16 horas pi. Há evidências de que os transcritos tardios também contêm sequências não-traduzidas na extremidade 5' e terminam com sequências de poli-timidina (poliT).

Uma classe intermediária de mRNAs com cinética de transcrição distinta tem sido caracterizada. Embora sejam dependentes da replicação do DNA viral como os genes tardios, os transcritos intermediários utilizam sítios de iniciação diferentes e apresentam uma cinética diferente de produção. Esses transcritos podem ser detectados entre 4 e 6 horas após a infecção e atingem expressão máxima ao redor de 6 a 8 horas pi, decrescendo durante o máximo da expressão dos genes tardios. Similarmente, os genes intermediários do vírus vaccinia são transcritos a partir do DNA viral recém-replicado e codificam fatores de transcrição necessários à expressão dos genes

tardios. Fatores de ativação dos genes do ASFV ainda não foram identificados, mas alguns produtos possuem homologia com fatores de transcrição do vírus vaccinia.

4.3.2. Síntese e modificação das proteínas

A produção das proteínas do ASFV inicia em fases bem precoces do ciclo e segue a mesma cinética da transcrição, resultando inicialmente na síntese de proteínas não-estruturais e, mais tardiamente, na produção das proteínas estruturais. As proteínas produzidas sofrem diferentes modificações após a tradução. Aproximadamente 100 proteínas virais de 10 a 220 kDa podem ser detectadas em células infectadas, e as proteínas tardias correspondem a aproximadamente o dobro das proteínas iniciais. Embora as proteínas estejam preferencialmente localizadas nas fábricas virais, outros padrões de localização são observados, incluindo o nuclear, citoplasmático difuso e em membranas celulares.

O ASFV codifica duas poliproteínas, a pp220 (pCP2475L) e a pp62 (pCP530R) que sofrem clivagem pela protease viral após a tradução e durante a morfogênese dos vírions, originando as proteínas estruturais maduras. A pp220 foi a primeira precursora de proteínas estruturais descrita para os vírus DNA e apresenta 2475 aminoácidos miristilados. Essa proliproteína sofre um processamento temporalmente regulado originando intermediários de 90 e 55 kDa, e as proteínas estruturais maduras p150, p37, p34 e p14. As duas poliproteínas são expressas tardiamente na infecção e seu processamento ocorre entre uma e três horas após a sua síntese. As proteínas resultantes se constituem nos principais componentes da camada de revestimento externo do núcleo dos vírions.

A proteína pS273R apresenta similaridade com proteases encontradas no vírus vaccinia e nos adenovírus, além de ser semelhante a proteases celulares. Esta enzima é uma protease de cisteína, responsável pela clivagem da p220, sendo encapsidada nos vírions. O ASFV produz efeitos adicionais em nível de tradução ou após esta tradução, afetando o direcionamento, estabilidade e

maturação das proteínas. O ASFV codifica uma proteína homóloga a enzima celular que conjuga proteínas com a ubiquitina celular (pI215L), direcionando-as para a degradação.

4.4 Replicação do DNA viral

A síntese de DNA viral em monócitos de suínos infectados *in vitro* inicia-se três a quatro horas após a infecção e atinge níveis máximos ao redor de 5 horas pi. O ASFV codifica várias enzimas que estão envolvidas na replicação do genoma, incluindo uma topoisomerase de DNA, helicase, polimerase, ligase e proteínas de associação com o DNA.

A replicação do genoma parece ocorrer em duas fases. Uma fase inicial, que ocorre no núcleo e uma tardia e mais proeminente, que ocorre no interior das fábricas virais. Em concordância com o papel do núcleo celular na replicação do DNA, a replicação viral é marcadamente inibida em células Vero enucleadas. No entanto, extratos citoplasmáticos coletados 8 horas pi foram capazes de suportar a síntese de DNA, indicando que o núcleo é requerido somente nas fases iniciais. Foi demonstrada a atividade de transporte citoplasma-núcleo de duas proteínas virais estruturais: a p37 e a proteína de reparo do DNA.

O mecanismo de replicação do genoma do ASFV não está bem esclarecido. A presença de dímeros formados pela ligação entre as sequências terminais do genoma sugere um mecanismo de replicação via formação de concatâmeros, cujas unidades genômicas estão ligadas entre si. Após a replicação, as moléculas de DNA resultantes, presentes nas fábricas virais, se condensam em uma estrutura pró-nucleóide que é inserida em partículas icosaédricas durante a maturação dos vírions.

Algumas proteínas codificadas pelo genoma viral provavelmente medeiam funções que indiretamente aumentam ou asseguram a fidelidade da replicação do genoma, incluindo aquelas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e no reparo no DNA. O aumento de atividade enzimática celular induzida pela replicação viral e/ou a presença de proteínas virais homólogas indicam que a timidina quinase, timidilato sintetase, ribo-

nucleotídeo sintetase e dUTPase virais proporcionam um aumento significativo na quantidade de desoxiribonucleotídeos disponíveis para a síntese de DNA. A dUTPase seria responsável por minimizar a incorporação errada de deoxiuridina genotóxica ao genoma viral. Além disso, o vírus codifica diferentes proteínas envolvidas no reparo do DNA, que realizam a remoção de nucleotídeos errados incorporados à cadeia nascente de DNA.

4.5 Morfogênese

A replicação viral ocorre primariamente em fábricas virais que são inicialmente observadas às 6-8 horas após a infecção. Entre 12 e 24 horas pi As fábricas virais contêm um acúmulo denso de um material membranoso amorfo, e uma quantidade crescente de capsídeos vazios imaturos e de partículas virais maduras.

Durante os estágios iniciais da morfogênese, a principal proteína estrutural, p72, é recrutada do citoplasma e se associa com membranas do RE. Estruturas membranosas laminares adotam uma forma poliédrica que progride para a formação do capsídeo na face convexa, e da capa do *core* na superfície côncava da membrana. A observação de que as membranas precursoras dos vírions apresentam duas camadas bilipídicas contíguas com a membrana do RE, além da presença de proteínas virais associadas a essa organela; e de proteínas virais no lúmen do RE (pXP124L), nas fábricas virais e em vírions purificados, sugerem que um colapso nas cisternas do RE permitiria que as suas membranas formassem as membranas internas do vírion.

A p54, uma proteína de ligação com a célula hospedeira e que se liga à dineína, é também crítica para os eventos precoces envolvendo o recrutamento dos precursores das membranas ao RE. Essa proteína é essencial para a replicação viral e sua supressão inibe a morfogênese anteriormente à formação dos precursores do envelope. Concomitantemente à formação do capsídeo, a camada protéica do *core* se forma na face interna da membrana e compreende principalmente produtos da proteólise das poliproteínas p220 e p62. O processamento das poliproteínas ocorre juntamente

com a montagem da partícula viral e é essencial à morfogênese do núcleo ou *core*.

A formação das fábricas virais envolve alterações drásticas no citoplasma da célula hospedeira, incluindo o rearranjo de organelas, das membranas e do citoesqueleto. A infecção pelo ASFV induz a perda da cadeia do compartimento de secreção tardio do trans Golgi. As mitocôndrias migram e se acumulam próximas às fábricas virais em um evento dependente dos microtúbulos, assumindo uma morfologia consistente com um aumento da respiração e em sincronia com a indução do estresse mitocondrial pelas proteínas virais, como a Hsp60. A cadeia de microtúbulos se desorganiza após o início da replicação viral e formação das fábricas virais, resultado da redistribuição das proteínas e perda funcional do centróssomo. As fábricas virais lembram agressomos, que são inclusões perinucleares que contêm acúmulos de proteínas celulares. Entre as semelhanças dessas estruturas estão o recrutamento dos chaperones e de mitocôndrias, formação de microtúbulos, rearranjo dos filamentos intermediários e o colapso da vimentina.

Embora os vírions maduros intracelulares sejam infecciosos, eles são transportados para a membrana plasmática onde são liberados por brotamento, formando os vírions extracelulares envelopados. A habilidade da proteína viral tardia p14.5 em se ligar ao DNA e interagir com a p72 sugere um papel no encapsidamento do genoma. No entanto, a supressão da p14.5 indica uma função adicional dessa proteína, envolvendo a movimentação de vírions intracelulares para a membrana plasmática. De modo semelhante ao transporte dos vírions nos microtúbulos para as fábricas virais no início da infecção, tardiamente os vírions recém-formados se alinham nos microtúbulos e, por transporte anterógrado, são transportados das fábricas virais para a membrana plasmática. Este transporte é dependente de quinesina, uma proteína motora convencional que é recrutada para as fábricas virais e para os vírions citoplasmáticos. Os vírions do ASFV na superfície celular também podem induzir a nucleação da actina, similarmente ao vírus vaccinia, que utiliza caudas de actina para facilitar a disseminação direta entre células.

5 Vírus da peste suína africana

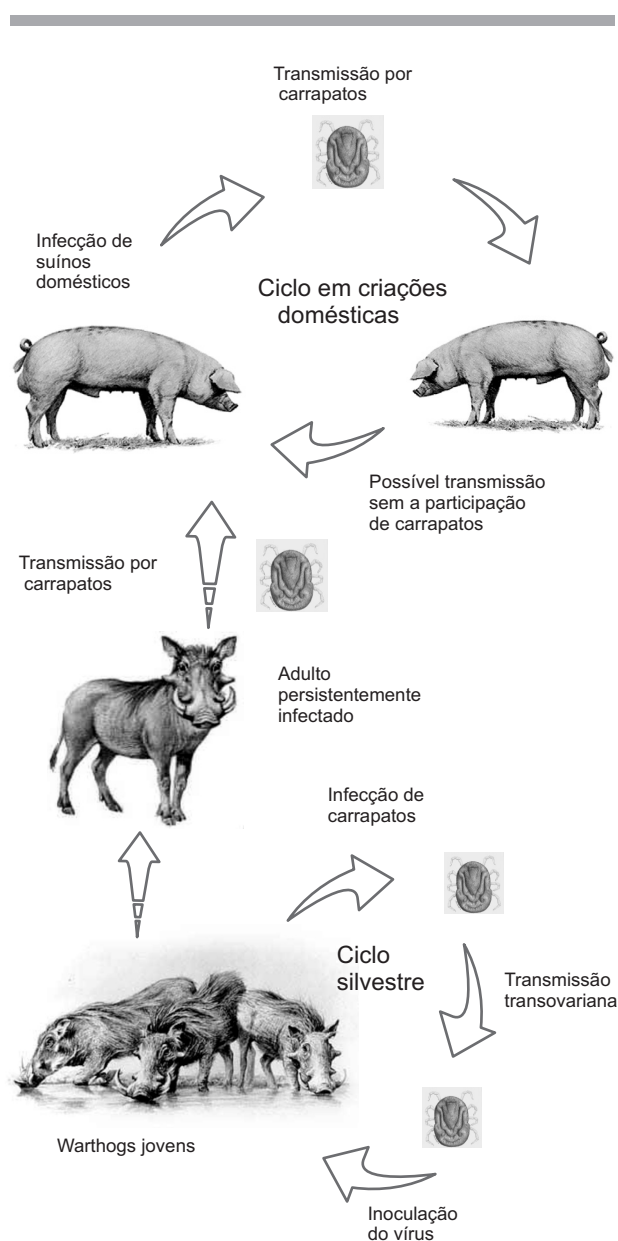
O ASFV é o agente etiológico da peste suína africana (ASF), uma doença severa de suínos domésticos e que afeta também suídeos selvagens, nos quais produz infecção subclínica ou de severidade moderada. Historicamente, a enfermidade tem sido restrita à África subsaariana, onde é endêmica, mas já foi esporadicamente encontrada em países europeus e americanos. A doença clássica em suínos domésticos é caracterizada por hemorragias generalizadas, principalmente em tecidos linfóides, e por altas taxas de mortalidade. O agente é mantido na natureza através de ciclos alternados de infecção em carrapatos e em suídeos selvagens.

5.1 Epidemiologia

Na África subsaariana, o ASFV é mantido em um ciclo selvático entre os suídeos selvagens e os carrapatos do gênero *Ornithodoros* (Figura 19.2). Os *warthogs* (*Potamochoerus aethiopicus*) são os principais hospedeiros naturais, mas o vírus também foi demonstrado em populações de *bushpigs* (suínos selvagens, *P. porcus*) e javalis (*Sus scrofa ferus*). Tentativas de reproduzir a infecção em outras espécies animais não obtiveram sucesso.

Na natureza, o vírus é encontrado em populações de carrapatos *Ornithodoros* sp., onde pode persistir durante anos. Nos carrapatos, o vírus pode ser transmitido pela via sexual e também de forma vertical para a prole, contribuindo para a sua perpetuação na natureza. Os carrapatos infectados se constituem no elo entre as populações de *warthogs* e os suínos domésticos, podendo introduzir a infecção principalmente em criações de suínos ao ar livre. Uma vez introduzido em criações domésticas, o vírus pode ser disseminar entre os animais por contato direto e indireto, sem a participação dos carrapatos. Em suínos com a infecção aguda, o vírus é detectado em todas as secreções e excreções, incluindo a secreção ocular, nasal, faríngea, genital, urina e fezes. A transmissão natural entre suínos provavelmente ocorre pela via oronasal.

Diferentemente dos suínos domésticos, a infecção de *warthogs* geralmente é subclínica e



Fonte: adaptada de Plowright et al. (1994).

Figura 19.2. Ciclo silvestre e doméstico do vírus da peste suína africana (ASFV) na África.

curso com níveis baixos de viremia. A maioria dos *warthogs* adultos em áreas enzoóticas são soropositivos e, provavelmente, muitos deles são persistentemente infectados. Outras espécies de suídeos selvagens (*bushpigs*, javalis) raramente apresentam sinais clínicos da infecção e são mais resistentes à transmissão por contato direto e indireto do que os suínos domésticos. No entanto, a duração da viremia nessas espécies pode se estender. Embora a replicação do ASFV *in vitro* em leucócitos de suínos domésticos e de *warthogs*

seja similar, a replicação, disseminação e indução de apoptose em linfócitos *in vivo* são reduzidas nos suídeos silvestres quando comparada com os suínos domésticos.

As taxas de morbidade e mortalidade da ASF em suínos domésticos podem atingir 100%. No entanto, vários fatores podem influenciar esses índices, incluindo a virulência da cepa viral. Após surtos de ASF, não é raro encontrar animais que sobreviveram à infecção. Esses animais geralmente apresentam uma infecção crônica ou subaguda e sobrevivem. Os animais que sobrevivem à infecção primária apresentam uma resposta imune capaz de proteger contra a reinfeção frente ao vírus homólogo, mas podem permanecer suscetíveis a cepas heterólogas. Animais portadores são importantes na manutenção e disseminação do agente. Estudos sorológicos em áreas endêmicas têm demonstrado índices de soropositividade de até 8% em suínos enviados ao abate.

Na natureza, o ASFV infecta carrapatos do gênero *Ornithodoros* sp. e pode ser isolado desses insetos até vários anos após a infecção. A infecção natural dos carrapatos pode ocorrer em todos os estádios de desenvolvimento, com eficiência de infecção variando entre 0,3 a 1,7%. Os carrapatos podem se infectar ao sugar sangue de suídeos virêmicos ou por transmissão sexual, transovariana e transtadial. Os títulos virais em carrapatos infectados coletados de *warthogs* variam entre 10^4 and 10^6 HAD₅₀. A infecção em carrapatos é caracterizada pelo estabelecimento de infecção persistente, na qual a replicação viral ocorre em níveis altos em certos tecidos e órgãos. Os carrapatos infectados excretam o vírus tanto na saliva como nos fluidos coxais. Diferenças na taxa de infecção, na dose infecciosa e em infecções persistentes têm sido observadas de acordo com a cepa viral.

A infecção pelo ASFV é endêmica na maioria dos países da África subsaariana e foi ocasionalmente detectada em países europeus, do Caribe e da América. O vírus foi introduzido na Europa mais de uma vez, provavelmente pelo movimento de animais ou de subprodutos. A partir da Península Ibérica, o vírus atingiu a França, Ilhas da Madeira, Sardenha e Malta, Bélgica e Holanda. Em todos os casos, a infecção parece ter sido prontamente erradicada. A infecção foi também

detectada em uma ocasião em Cuba (1971), onde a erradicação exigiu o sacrifício de 400.000 animais. No final da década de 1970, o ressurgimento da doença na Península Ibérica foi acompanhado de surtos na República Dominicana, Haiti, Cuba e Brasil. Esses surtos também foram prontamente combatidos. Atualmente a doença se mantém endêmica apenas na metade sul da África.

5.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Quando os suínos são expostos pela via oronasal, o vírus replica inicialmente na mucosa faríngea, nas tonsilas e os linfonodos regionais, de onde se dissemina sistemicamente pelo sangue. O vírus infecta primariamente as células do sistema fagocítico mononuclear, incluindo macrófagos teciduais e linhagens específicas de células reticulares. Os tecidos infectados apresentam lesões extensas, principalmente quando infectados por cepas de alta virulência. Cepas de virulência moderada também infectam esses tipos celulares, mas os graus de envolvimento tecidual e a severidade das lesões são menores. A habilidade do ASFV em replicar e induzir citopatologia nos macrófagos *in vivo* parece ser crítico para a virulência do vírus.

Na patogenia da infecção pelo ASFV, a apoptose ou morte celular programada parece desempenhar um papel importante. A infecção de suínos resulta em apoptose de macrófagos, de megacariócitos e principalmente de linfócitos. A apoptose dos linfócitos é significativa nos linfonodos, no baço e no timo, e é a causa primária da depleção de linfócitos e imunodeficiência que é característico da doença. Diferentemente dos macrófagos, os linfócitos não são suscetíveis à infecção pelo ASFV. Isto sugere que um mecanismo indireto, possivelmente envolvendo citoquinas secretadas pelos macrófagos infectados, seja responsável pela apoptose dos linfócitos.

As hemorragias, edemas e infusões de líquidos nas cavidades corporais parecem estar associadas com trombocitopenia, coagulopatia, fibrinólise e disfibrinogenemia, e também com a perda da integridade do endotélio vascular. A formação de complexos imunes e liberação de

prostaglandina E por macrófagos infectados podem ser responsáveis pela agregação plaquetária e trombocitopenia. A fibrinólise e desfibrinogemia parecem estar associadas com a liberação de ativadores do plasminogênio por macrófagos ativados em resposta à infecção. As lesões observadas em casos crônicos têm sido atribuídas a componentes auto-imunes, incluindo a deposição de complexos imunes e indução de inflamação nos rins, pulmões e pele.

Diferentes genes do ASFV e diferentes regiões gênicas estão associados com a patogenia e a virulência da infecção em suínos domésticos, mas não afetam a replicação do vírus em macrófagos *in vitro*. Dois desses genes, o UK (DP96R) e o 23-NL (DP71L ou 114L), estão localizados próximos à região altamente variável do genoma e se constituem em prováveis fatores de virulência e, portanto, alvos para a manipulação genética para a produção de mutantes vacinais.

A infecção de suínos domésticos pode resultar em diferentes formas clínicas, variando desde infecção subclínica até doença fatal, dependendo de fatores virais e do hospedeiro. Na forma aguda da doença, o período de incubação varia entre cinco e 15 dias. Os animais infectados apresentam febre (41-42°C), anorexia, congestão, cianose da pele, aumento da frequência cardíaca e respiratória, descarga nasal, incoordenação, vômito e finalmente coma e morte. Os animais infectados com o ASFV geralmente morrem entre dois e nove dias após a infecção. Os achados patológicos na infecção aguda incluem leucopenia, linfopenia de linfócitos T e B, trombocitopenia, apoptose de células mononucleares e de linfócitos, hemorragias nos linfonodos, no fígado, nos rins, e nos trato respiratório e gastrointestinal, congestão da pele e de membranas serosas e grave edema pulmonar interlobular.

A infecção subaguda dura aproximadamente três a quatro semanas, e os animais apresentam febre remitente, perda de peso, pneumonia, dispnéia, insuficiência cardíaca e edema nas articulações. Hemorragias nos linfonodos e em outros tecidos podem ser observados na necropsia, mas não são tão frequentes como nas infecções agudas.

A infecção persistente pelo ASFV tem sido descrita em *warthogs* e em suínos domésticos que

sobrevivem à infecção. Em condições experimentais, a persistência viral é a seqüela observada em suínos domésticos que sobrevivem à infecção. Nesses animais, o DNA viral pode ser detectado por PCR nos monócitos até 500 dias após a infecção; no entanto, partículas víricas infectivas não são consistentemente isoladas dessas amostras.

A exemplo dos outros vírus DNA grandes, o AFV afeta e modula a resposta imunológica do hospedeiro. Os macrófagos infectados medeiam alterações na resposta celular e, provavelmente, desempenham um papel importante na apoptose severa observada em tecidos linfóides. O ASFV inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IFN, e IL-8, enquanto induz a produção de TGF pelos macrófagos infectados. No entanto, um aumento da expressão do TNF tem sido descrita na infecção pelo ASFV *in vitro* e *in vivo*. Esse aumento pode possuir um papel central na patogenia da infecção, incluindo alterações na permeabilidade vascular, na coagulação e na indução de apoptose em linfócitos não infectados.

Os achados hematológicos nos animais doentes incluem leucopenia, acompanhada de linfopenia absoluta, monocitopenia e neutropenia. A leucopenia parece ser devida à destruição de linfócitos, monócitos e neutrófilos pela replicação viral. No entanto, a infecção de linfócitos ainda não foi inequivocamente demonstrada. A trombocitopenia se desenvolve em estágios avançados, e os níveis de plaquetas podem ficar drasticamente reduzidos.

Os achados macroscópicos nos casos agudos e subagudos incluem cianose (azul-purpúrea) na pele, principalmente no focinho, extremidades das orelhas, cauda e extremidades dos membros. Níveis variados de congestão, juntamente com petéquias e equimoses estão frequentemente presentes na face lateral e inferior do pescoço, no peito, abdome e membros.

Aumento de volume e hemorragias em linfonodos superficiais e viscerais se constituem nos achados mais marcantes da forma aguda da doença. As cavidades corporais geralmente contêm uma quantidade variável de líquido amarelado ou sanguinolento, material fibrinoso e coágulos sangüíneos. As serosas apresentam congestão, petéquias ou equimoses. Hemorragias no peri-

cárdio e endocárdio também são freqüentemente observadas em casos agudos. Hemorragias difusas ou petéquias/equimoses também são encontradas em uma variedade de órgãos e tecidos, como a mucosa traqueal e faríngea, espaço pleural, estômago, rins, entre outros.

As lesões na forma crônica diferem marcadamente, sobretudo, em relação às hemorragias e necrose do tecido linforreticular, que são achados pouco freqüentes e menos proeminentes do que nas formas aguda e subaguda.

5.2.1 A infecção nos carrapatos

Após a infecção experimental do *Ornithodoros porcinus porcinus*, uma replicação inicial ocorre nas células fagocíticas presentes no epitélio do intestino. Aos 15 dias pi a replicação viral é detectada em células não diferenciadas do trato digestivo. A disseminação da infecção do intestino para outros tecidos, incluindo as glândulas salivares e glândulas coxais, ocorre em duas a três semanas após a infecção. Sítios secundários de replicação viral incluem os hemócitos (tipo I e III), tecido conjuntivo, glândulas coxais, glândulas salivares e tecido reprodutivo. Para que a infecção pelo ASFV no artrópode seja generalizada, a replicação nas células do intestino parece ser de grande importância. Essa importância foi demonstrada através da infecção dos carrapatos com a cepa patogênica Malawi Lil20/1, que não é capaz de replicar nas células intestinais ao infectar os carrapatos.

5.3 Imunidade

A resposta humoral e celular são componentes importantes da imunidade contra o ASFV. Anticorpos anti-ASFV são capazes de proteger os suínos de uma infecção grave e fatal. Embora anticorpos neutralizantes direcionados às proteínas virais p30, p54 e p72 sejam encontrados em animais convalescentes, estes não são suficientes para conferir proteção. Linfócitos T CD8+, que se desenvolvem em seis a sete dias após a infecção, parecem desempenhar um importante papel na resposta imune protetora contra o ASFV.

Em suínos que sobrevivem à infecção observa-se imunidade sólida contra a cepa homóloga. Animais que sobrevivem à infecção por cepas de virulência moderada ou por variantes atenuadas desenvolvem uma resistência de longa duração ao desafio frente a vírus homólogos, mas raramente frente a vírus heterólogos.

5.4 Diagnóstico

O reconhecimento de surtos de ASF aguda não é difícil quando os achados clínico-patológicos e epidemiológicos são analisados. No entanto, a dificuldade ocorre no diagnóstico de infecção subaguda, crônica e subclínica, principalmente em países onde a enfermidade é endêmica em suínos criados ao ar livre.

Sempre que possível, o diagnóstico da ASF deve ser confirmado por testes laboratoriais, e para isto uma gama de técnicas está disponível. Nestes testes incluem-se métodos para detecção de vírus, antígenos e ácidos nucleicos virais, além de anticorpos específicos. O teste de hemadsorção (HAD) é um teste sensível e rotineiramente utilizado para detectar o ASFV após inoculação em cultivo celular. No entanto, nem todas as cepas do ASFV apresentam atividade de hemadsorção. Essas cepas podem, então, ser identificadas pelo efeito citopático (ECP) seguido da detecção de antígenos virais por imunofluorescência. Isolados de campo do ASFV replicam bem em cultivos de monócitos e macrófagos suínos, e podem ser adaptados a replicar em células de linhagem, com as PK-15 e Vero.

Vários testes de ELISA têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos específicos contra o ASFV e são particularmente úteis para o diagnóstico rápido e em grande escala. Recentemente, métodos baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR) e PCR em tempo real têm sido desenvolvidos, constituindo-se em métodos sensíveis e específicos de detecção do agente, mesmo em estágios pré-clínicos da infecção.

O diagnóstico diferencial deve considerar a peste suína clássica, babesiose, tripanossomíase, erisipela, pasteurelose, salmonelose e antrax.

5.5 Controle e profilaxia

Atualmente não existem vacinas disponíveis contra o ASFV e o controle da infecção baseia-se em procedimentos de quarentena e abate dos animais infectados. Tentativas de imunizar animais com extratos de células infectadas, com o sobrenadante de leucócitos de suínos infectados e com vírions inativados falharam na indução de uma resposta imune protetora. A imunização de suínos com uma vacina atenuada por deleção de genes de virulência conferiu proteção contra o vírus homólogo, mas não contra cepas heterólogas.

O controle da ASF em áreas de alto risco na África é essencial e deve se concentrar em medidas que evitem o contato entre os suínos domésticos e os reservatórios silvestres do vírus, juntamente com procedimentos como vazio sanitário e desinfecção de instalações e ambientes. Na África do Sul e Quênia, essa política tem sido aplicada com sucesso considerável. Outras medidas de controle incluem a erradicação dos carrapatos e o controle da movimentação de animais, e da importação e exportação de suínos e seus subprodutos. Países livres devem concentrar esforços para impedir a introdução do agente, através de barreiras sanitárias que impeçam a entrada de animais e subprodutos de áreas potencialmente de risco.

6 Bibliografia consultada

- BLASCO, R. et al. Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. *Virology*, v.168, p.330-338, 1989.
- DIXON, L.K. et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.100, p.117-134, 2004.
- ESTEVEZ, A.; MARQUEZ, M.I.; COSTA, J.V. Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology*, v.152, p.192-206, 1986.
- GOMEZ-PUERTAS, P. et al. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, v.243, p.461-471, 1998.
- HINGAMP, P.M. et al. A ubiquitin conjugating enzyme encoded by African swine fever virus. *The EMBO Journal*, v.11, p.361-366, 1992.
- JOUVENET, N. et al. Transport of african swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. *Journal of Virology*, v.78, p.7990-8001, 2004.
- KLEIBOEKER, S.B. et al. African swine fever virus infection in the argasid host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. *Journal of Virology*, v.72, p.1711-1724, 1998.
- KONNO, S.; TAYLOR, W.D.; DARDIRI, A.H. Acute African swine fever: proliferative phase in lymphoreticular tissue and the reticuloendothelial system. *The Cornell Veterinarian*, v.61, p.71-84, 1971.
- MISKIN, J.E. et al. A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science*, v.281, p.562-565, 1998.
- MONTGOMERY, R.E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology*, v.34, p.159-191, 1921.
- OURA, C.A.; POWELL, P.P.; PARKHOUSE, R.M. African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *The Journal of General Virology*, v.79, p.1427-1438, 1998.
- PICCONE, M.E. et al. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *Journal of Virology*, v.78, p.1858-1864, 2004.
- PLOWRIGHT, W.; THOMSON, G.R.; NESER, J.A. African swine fever. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (eds.) *Infectious diseases of livestock*. Cape Town, South Africa: Oxford, 1994. Cap.51, p.568-599.
- SIMON-MATEO, C.; ANDRES, G.; VINUELA, E. Polyprotein processing in African swine fever virus: a novel gene expression strategy for a DNA virus. *The Embo Journal*, v.12, p.2977-2987, 1993.
- TULMAN, E.R.; ROCK, D.L. Novel virulence and host range genes of African swine fever virus. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.456-461, 2001.

1 Introdução	527
2 Histórico e classificação	527
3 Estrutura e propriedades dos vírions	528
3.1 Estrutura do genoma, expressão gênica e replicação	529
4 Calicivírus de importância em medicina veterinária	531
4.1. Calicivírus felino	531
4.1.1. Epidemiologia	531
4.1.2. Patogenia e sinais clínicos	531
4.1.3. Prevenção e controle	532
4.2 Vírus do exantema vesicular dos suínos	532
5 Outros calicivírus	533
5.1 Vírus dos leões marinhos de San Miguel	533
5.2 Lagovírus (vírus da doença hemorrágica dos coelhos)	533
5.3 Norovírus e sapovírus	534
6 Diagnóstico e controle	534
7 Bibliografia consultada	535

¹ Tradução: Luiz Carlos Kreutz

1 Introdução

A família *Caliciviridae* possui importantes patógenos de animais, incluindo o calicivírus felino (FCV), o vírus do exantema vesicular dos suínos (VESV), o vírus dos leões marinhos de San Miguel (SMSV) e o vírus da doença hemorrágica dos coelhos (RHDV). Além disso, calicivírus também já foram isolados de cães, macacos, bovinos, martas, galinhas, répteis, anfíbios e insetos. Geralmente, os calicivírus estão associados à doenças do trato respiratório, doenças gastrointestinais ou doenças sistêmicas. Em humanos, os calicivírus são importantes causas de gastroenterites, principalmente em crianças e idosos.

Os calicivírus possuem um amplo espectro de hospedeiros e devido a similaridades de morfologia, dimensões e propriedades físicas, foram originalmente classificados na família *Picornaviridae*. Possuem vírions pequenos, sem envelope, e apresentam como genoma uma molécula de RNA linear de fita simples e polaridade positiva. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, foi possível realizar uma análise mais precisa desses vírus, principalmente da sequência de nucleotídeos do genoma e das proteínas codificadas. Com essas informações, percebeu-se que os calicivírus não eram relacionados aos picornavírus, e assim foram classificados em uma nova família, denominada *Caliciviridae*.

A família *Caliciviridae* é composta por quatro gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* e *Sapovirus*. Os vesivírus e lagovírus infectam principalmente animais. Os norovírus e sapovírus infectam primariamente humanos, mas já foram também encontrados em bovinos e suínos. Atualmente, discute-se a possibilidade de que animais domésticos possam ser os reservatórios dos calicivírus que infectam humanos.

2 Histórico e classificação

Os calicivírus foram originalmente descritos nos Estados Unidos, em meados da década de 1930, associados com uma doença vesicular contagiosa grave, posteriormente denominada

exantema vesicular dos suínos (VES). Esse vírus, até então desconhecido, foi denominado vírus do exantema vesicular dos suínos (VESV). Devido a similaridades físicas, o agente foi originalmente classificado como vírus da febre aftosa (FMDV). No entanto, o VESV foi posteriormente reconhecido como um novo agente viral, principalmente porque os hospedeiros eram diferentes daqueles do FMDV. Em 1972, um calicivírus foi isolado de leões marinhos na ilha de San Miguel, Califórnia, e denominado de *San Miguel sea lion virus* (SMSV). O isolamento do SMSV foi realizado a partir de fetos de leões marinhos abortados. O VESV e o SMSV são morfológica e imunologicamente similares e compartilham características genéticas. Esses vírus causam doenças vesiculares e compõem um genogrupo único.

O calicivírus felino (FCV) foi isolado na década de 1950 de um surto de doença em felinos. Inicialmente acreditava-se que a doença era causada pelo vírus da panleucopenia felina (FPLV), um membro da família *Parvoviridae*. Observou-se, no entanto, que o vírus isolado produzia efeito citopático com extrema rapidez em cultivos celulares de origem felina, o que não poderia ser atribuído ao FPLV. O FCV está frequentemente associado com doença respiratória em felinos e é atualmente considerado um dos principais patógenos dessa espécie. Os três calicivírus (VESV, SMSV e FCV) são classificados no gênero *Vesivirus*.

Em 1984, na China, observou-se uma doença hemorrágica em coelhos, da qual foi isolado um agente viral denominado vírus da doença hemorrágica dos coelhos (RHDV). Desde então, a doença tem sido detectada em outros países asiáticos e também na Europa. Em 1986, na Europa, isolou-se um vírus de lebres com doença hemorrágica, o qual foi denominado vírus da síndrome das lebres marrons européias (EBHSV). Estudos retrospectivos em amostras de fígado preservadas datam a existência do vírus pelo menos desde 1976. Ambos os vírus causam doenças similares, porém diferem antigenicamente e também no espectro de hospedeiros que infectam. O RHDV e o EBHSV compõem o gênero *Lagovirus*.

Os calicivírus entéricos humanos foram descritos pela primeira vez após análises por meio de imunoeletromicroscopia em amostras de fezes obtidas de surtos de diarreia em crianças de escolas de Norwalk, Ohio, em 1968. Esse vírus, denominado de agente *Norwalk*, tem sido, desde então, membro de um grande grupo de calicivírus causadores de gastroenterite em humanos. Esses vírus gastroentéricos, denominados vírus pequenos de morfologia arredondada (*small round structured virus* = SRSV), não possuem as depressões peculiares na forma de cálice observadas por microscopia eletrônica nos calicivírus e, por isso, não foram classificados na família *Caliciviridae*. Um segundo grupo de vírus, os calicivírus humanos clássicos (HuCVs), que possuem as típicas depressões em forma de cálice na superfície, causam doenças entéricas idênticas aquelas causadas pelo SRSV. Os vírus originalmente classificados como SRSV compõem agora o gênero *Norovirus* e o HuCVs são classificados no gênero *Sapovirus*.

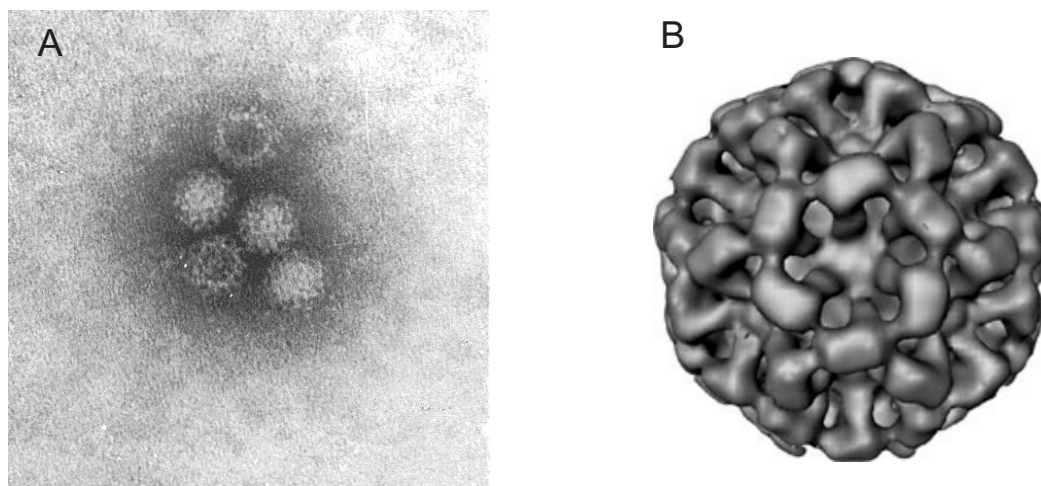
3 Estrutura e propriedades dos vírions

Os calicivírus são vírions pequenos (27-40 nm), icosaédricos, sem envelope, formados por 180 cópias idênticas de uma única proteína, arranjadas em 90 dímeros, com a forma de arcos. A associação dessas unidades forma 32 depressões em forma de cálice na superfície dos vírions. A forma dessas depressões suscitou o termo calicivírus. Os vírions são relativamente resistentes ao calor e desinfetantes, éter e clorofórmio, mas não resistem muito a condições de pH baixo (3 a 5). A densidade das partículas víricas varia entre 1.33 e 1.41 g/cc. Outras características físicas e moleculares importantes dos calicivírus encontram-se discriminadas na Tabela 20.1. A Figura 20.1 apresenta uma micrografia eletrônica de coloração negativa de um calicivírus e um modelo de reconstrução tridimensional de uma partícula do vírus Norwalk.

Tabela 20.1. Propriedades biológicas, estruturais e moleculares dos vírus pertencentes a família *Caliciviridae*.

	<i>Vesivirus</i>	<i>Lagovirus</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Sapovirus</i>
Espectro de hospedeiros	Ampla	Coelhos, lebres	Humanos, suínos, camundongos	Humanos, bovinos, suínos
Sinais clínicos	Lesões vesiculares, abortos, infecção do Trato respiratório superior	Hepatite, doença Hemorrágica	Hepatite, doença hemorrágica	Hepatite, doença hemorrágica
Replicação em cultivo celular	Sim	Não	Apenas o norovírus murino	Apenas o calicivírus entérico suíno ¹
Morfologia típica de calicivírus (ME)	Sim	Sim	Não	Sim
Extensão do genoma	7.7 - 8.3 kb ²	7.35	7.65	7.4
Número de ORFs	3	2	3	2
Extensão da ORF1 (aminoácidos)	1763-1878 ²	2345	1790	2281
Massa da proteína do capsídeo (kDa)	73-78 ² ; 59-61 ⁴	60	58-60	58-60

¹ Apenas a cepa adaptada em cultivo; ² FCV-SMSV/VESV; ³ Proteína precursora do capsídeo; ⁴ Proteína do capsídeo madura



Fonte: A) Dra C. Büchen-Osmond, ICTVdB; B) Dr B. V. Venkataran, Baylor College of Medicine.

Figura 20.1. Vírions da família *Caliciviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica de coloração negativa de um calicivírus típico; B) Modelo tridimensional de uma partícula do vírus Norwalk.

3.1 Estrutura do genoma, expressão gênica e replicação

O genoma dos calicivírus é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, linear, de polaridade positiva, cuja extensão varia entre 7.3 e 8.3 kb, de acordo com o gênero (Tabela 20.1). O genoma possui uma pequena proteína covalentemente ligada na extremidade 5' (5' VPg) e é poliadenilado em sua extremidade 3' (Figura 20.2). No citoplasma das células infectadas, o genoma serve como RNA mensageiro (mRNA). O RNA genômico possui três ORFs (seqüências abertas de leitura). A ORF-1, localizada na porção 5', ocupa aproximadamente 65% da extensão do genoma. Esta ORF codifica as proteínas não-estruturais (além da VPg), que são produzidas pela

tradução direta do RNA genômico. As proteínas não-estruturais incluem a replicase viral (polimerase de RNA dependente de RNA), protease de cisteína e helicase de RNA. Algumas delas ainda não tiveram a sua função identificada. Estas proteínas apresentam seqüências específicas de aminoácidos também presentes nas proteínas com funções equivalentes dos picornavírus. A ORF-1 é traduzida em uma poliproteína precursora, que é posteriormente clivada pela protease nas proteínas individuais.

Após a sua produção pela clivagem da poliproteína, a replicase viral sintetiza uma cópia de RNA de sentido antígenômico (polaridade negativa). Esta molécula servirá de molde para a síntese de um RNA mensageiro subgenômico (mRNAsg) que será traduzido na proteína

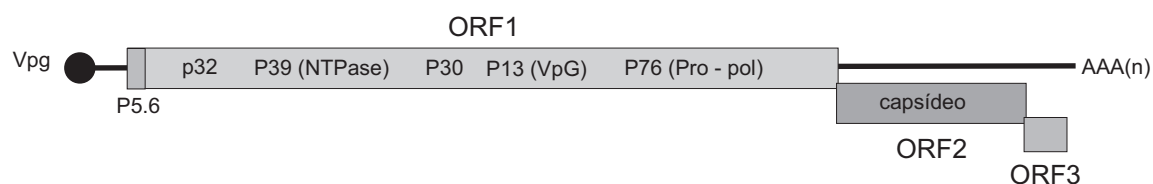


Figura 20.2. Estrutura e organização do genoma do calicivírus felino (FCV). A posição e massa molecular das proteínas codificadas pelas ORFs estão indicadas.

do capsídeo. Em etapas tardias do ciclo, o DNA complementar serve de molde para a síntese do RNA genômico. A replicase viral é responsável por todas essas etapas.

No terço 3' do genoma, encontra-se a ORF-2, que codifica a proteína do capsídeo. Esta ORF não é traduzida diretamente a partir do RNA genômico. Ao contrário, a proteína do capsídeo é produzida pela tradução de um mRNAsg, que, por sua vez, é produzido pela transcrição da cópia de RNA de sentido antígenômico. A transcrição do mRNAsg inicia imediatamente antes do códon de iniciação da ORF, que codifica a pro-

teína do capsídeo, e termina na extremidade 3' do RNA antígenômico. Esse mRNAsg também é poliadenilado e contém a VPg ligada à porção 5'. Nos lagovírus e sapovírus, a ORF-2, que codifica as proteínas não-estruturais, encontra-se na mesma sequência de leitura da ORF-2 que, codifica a proteína do capsídeo (Figura 20.3). Nesses vírus, acredita-se que a proteína do capsídeo seja clivada a partir da poliproteína não-estrutural, pela ação da protease de cisteína. Porém, esta proteína também pode ser produzida a partir do mRNAsg.

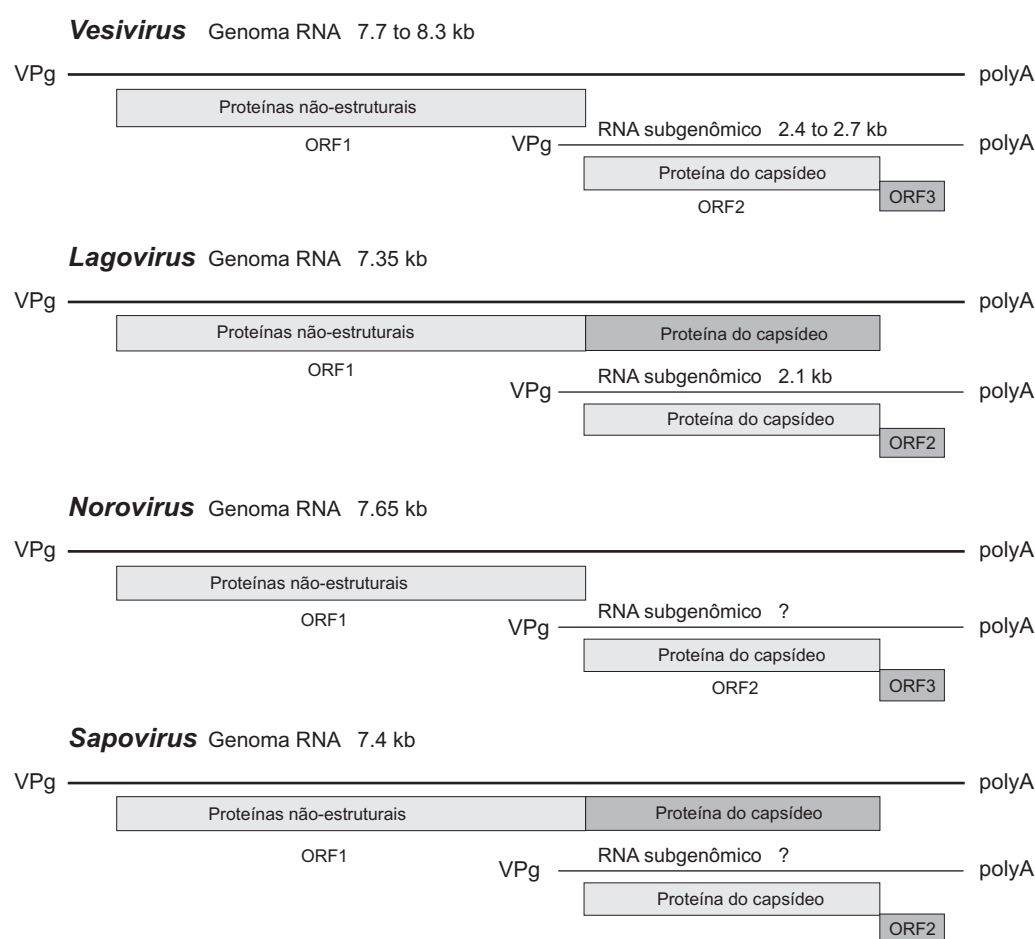


Figura 20.3. Organização genômica dos vírus dos gêneros *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* e *Sapovirus*. A linha contínua representa o RNA genômico com a proteína de ligação do genoma (VPg) na extremidade 5' e a cauda poliA na extremidade 3'. Os RNAs mensageiros subgenômicos (tanto os já caracterizados como os prováveis) estão demonstrados abaixo da região da qual eles são transcritos. Os retângulos abaixo do RNA genômico representam as ORFs com a provável posição das respectivas proteínas. Nos lagovírus e sapovírus, a proteína do capsídeo pode ser produzida tanto pela tradução direta do genoma e clivagem a partir da proteína não-estrutural como pela tradução de um mRNAsg.

Uma pequena ORF adicional (ORF-3) está presente na porção extrema da região 3' do RNA genômico e é traduzida a partir do mRNAsg (ver Figuras 20.2 e 20.3). Essa ORF codifica uma pequena proteína básica, que é incluída em quantidade pequena nos capsídeos dos vírions maduros. A função dessa proteína parece estar relacionada ao empacotamento do RNA genômico e estabilização da partícula viral. A ORF-3 parece ser traduzida após a tradução da ORF-2, utilizando um mecanismo de terminação/reiniciação.

Os calicivírus penetram por endocitose e replicam no citoplasma das células hospedeiras, mediadas por receptores, e a penetração depende da acidificação dos endossomos. O VESV e FCV apresentam uma replicação rápida e lítica em células de cultivo derivadas das espécies homólogas. O FCV produz arredondamento e desprendimento das células do tapete em células de linhagem de rim felino (CRFK). O VESV também replica em células de linhagem Vero. Dentre os prováveis calicivírus recentemente isolados, aqueles derivados de gastroenterite de suínos e de doença vesicular genital de cães replicam bem em células de cultivo; os outros não são facilmente cultiváveis.

4 Calicivírus de importância em medicina veterinária

4.1 Calicivírus felino

O calicivírus felino (FCV) é um agente cosmopolita, e é considerado um patógeno importante de felídeos. É comum em gatos domesticados, e já foi isolado de guepardos na Austrália, e de diversas outras espécies de felinos em zoológicos. O agente também já foi isolado de casos de glossite em cães. Até o presente, apenas um único sorotipo foi identificado, isso provavelmente porque o anti-soro produzido contra uma cepa do FCV reage com todos os isolados. Essas reações sorológicas cruzadas devem-se principalmente à presença de seqüências conservadas de aminoácidos na proteína do capsídeo, e que são importantes para a ligação do vírus aos receptores celulares. Algumas diferenças na proteção

cruzada têm sido observadas entre cepas, porém outras seqüências de aminoácidos são responsáveis pela reatividade cruzada.

4.1.1 Epidemiologia

A infecção pelo FCV parece estar amplamente difundida nas populações de felinos domésticos e também tem sido detectada em alguns felídeos silvestres. A transmissão natural ocorre por contato direto ou indireto por fômites contaminados ou por aerossóis. O vírus pode ser carreado mecanicamente entre animais pelo próprio homem. O FCV é prontamente transmitido por animais durante a infecção aguda. No entanto, a maior fonte de vírus parece ser os animais cronicamente infectados, que são portadores subclínicos da infecção. O estado de portador se desenvolve após a fase aguda da doença, e é importante na manutenção do FCV na população felina. Os gatos infectados cronicamente apresentam o FCV nas tonsilas e faringe, onde o vírus replica em níveis baixos durante meses ou até anos. Essa replicação em baixos níveis nas tonsilas e a constante disseminação ocorre mesmo na presença de anticorpos protetores. O estresse pode participar na recrudescência da infecção e aumento da excreção viral. O vírus é excretado em secreções oro-nasais.

Recentemente, alguns estudos demonstraram que calicivírus antigenicamente distintos do vírus original pode ser recuperado de gatos com infecção crônica. Isso demonstra que as mutações produzidas durante a replicação, uma característica comum dos vírus RNA, é importante no estabelecimento e manutenção da infecção crônica.

4.1.2 Patogenia e sinais clínicos

O vírus penetra principalmente pela via oronasal e replica inicialmente na orofaringe. O período de incubação da enfermidade varia entre dois e seis dias, e os animais infectados podem apresentar uma variedade de sinais clínicos. A infecção pode ser subclínica ou aguda, e, na maioria das vezes, apresenta baixa morbidade e baixa mortalidade. No entanto, em abrigos ou colônias, a morbidade pode ser alta após a introdução do

agente. As infecções mais severas são caracterizadas por rinite, traqueíte e pneumonia, e produção de vesículas na cavidade oral, as quais evoluem para ulcerações do epitélio. As lesões vesiculares são geralmente restritas às cavidades nasal e oral. O quadro clínico também apresenta febre, anorexia e descarga ocular e nasal. Uma síndrome de claudicação transitória pode também ser observada em gatinhos e se caracteriza por dor muscular, edema das articulações (poliartrite) e lami-nite. A infecção de fêmeas prenhes pode resultar em abortos. Nas infecções com cepas de FCV mais virulentas, a mortalidade pode atingir 30% em gatos com idade inferior a 12 semanas, e está geralmente associada com extensiva pneumonia e consolidação pulmonar. Além disso, cepas altamente virulentas têm sido descritas recentemente, associadas com surtos caracterizados por icterícia, edema e alta mortalidade. O estado de portador crônico pode se estabelecer em animais que se recuperam da infecção.

4.1.3 Prevenção e controle

Existem atuamente diversas vacinas para o FCV, tanto monovalentes como associadas com o herpesvírus felino. Existem vacinas atenuadas para aplicação intranasal, intraconjuntival e intramuscular. No entanto, sabe-se que a vacinação não previne a infecção. O número limitado de cepas de FCV incluídas nas vacinas pode não induzir proteção cruzada contra todas as cepas que circulam na população felina. Além disso, algumas cepas, como a F9, têm sido usadas por muitos anos e podem não ser antigenicamente relevantes para a proteção contra isolados circulantes no momento, e que se encontram disseminadas na população felina. Gatos vacinados podem se infectar com cepas heterólogas; e, em alguns casos, podem disseminar o vírus infectante por um determinado tempo após uma infecção subclínica. A utilização de vacinas vivas modificadas é geralmente segura. Porém, é possível a produção de sinais clínicos leves, particularmente em gatinhos, logo após a primovacinação. Os animais devem ser vacinados a partir dos três meses de idade, quando os níveis de anticorpos maternos já se reduziram significativamente.

4.2 Vírus do exantema vesicular dos suínos

A importância maior do VESV deve-se ao fato de o agente produzir manifestações clínicas confundíveis com a febre aftosa. Por isso, possui importância estratégica e se constitui em doença de notificação obrigatória, devendo ser diferenciada de outras doenças vesiculares de suínos. Já foram identificados 13 diferentes sorotipos, classificados de A a M. Alguns desses sorotipos são indistinguíveis do vírus isolado de leões marinhos (SMSV). Infecções naturais pelo VESV já foram identificadas em suínos, eqüinos, caninos e animais silvestres. Os mamíferos marinhos se constituem nos seus prováveis reservatórios. O VESV é considerado extinto das populações domésticas de suínos, mas ainda parece existir em mamíferos marinhos. Isto pode representar um risco potencial de reintrodução do agente em criações de suínos.

O VESV se dissemina pelo contato direto com animais infectados e também por via oral, pela alimentação com restos de alimentos contendo tecidos crus de animais infectados. O VESV foi identificado, pela primeira vez, no início da década de 1930, em surtos amplamente disseminados e aparentemente sem relação entre si. O único fator epidemiológico comum aos surtos era o fato de ocorrerem em granjas que alimentavam suínos com restos de alimentos não-cozidos, oriundos de restaurantes que serviam frutos do mar. Surtos posteriores foram também associados com a alimentação de restos crus ou mal cozidos de carne de suínos infectados. Esses surtos estavam limitados à Califórnia até o ano de 1951, quando um trem, carregado com carcaças frescas de suínos da Califórnia, deixou resíduos no estado de Wyoming, as quais foram subsequentemente fornecidas a suínos. Esse fato deu início a uma epizootia que atingiu 42 estados e somente terminou no final de 1956. As medidas tomadas para a erradicação da enfermidade incluíram a identificação e sacrifício dos animais doentes, quarentena e proibição da alimentação de suínos com restos crus de alimentos. Essa doença foi declarada oficialmente erradicada dos EUA em 1959, após três anos consecutivos sem novos ca-

sos. Além dos EUA, a enfermidade já foi relatada na Islândia e no Havaí.

A infecção de suínos pelo VESV resulta em febre (40,5-41°C), seguida da formação de vesículas nas regiões mais frias do corpo, como as narinas, lábios, língua e mucosa oral. As vesículas geralmente se rompem após 48-72 horas, deixando úlceras circulares. O rompimento das vesículas resulta no extravasamento do fluido para os tecidos vizinhos, principalmente a mucosa oral e também o espaço interdigital, sola e a banda coronária dos cascos. O aparecimento de vesículas secundárias nos pés causa imensa dor, e os suínos podem relutar e mesmo se recusar a caminhar até a recuperação. A morbidade nos rebanhos afetados era geralmente alta e a mortalidade geralmente baixa. No entanto, algumas cepas estavam associadas com maiores índices maiores de mortalidade. Clinicamente, a enfermidade é muito semelhante à febre aftosa, porém apresenta um curso mais brando e geralmente se resolve em menos de duas semanas.

5 Outros calicivírus

5.1 Vírus dos leões marinhos de San Miguel

O vírus dos leões marinhos de San Miguel (SMSV) já foi isolado de muitas espécies de cetáceos e pinípedes (focas, leões marinhos, elefantes marinhos, lobos marinhos e morsas), e também de peixes marinhos. Anticorpos contra diversos sorotipos do SMSV e do VESV têm sido detectados nessas espécies. Dessa forma, propôs-se que as populações de mamíferos marinhos possam servir de reservatórios, a partir das quais o SMSV e o VESV poderiam ser reintroduzidos nas espécies domésticas. De fato, o SMSV pode infectar animais, como os suínos e bovinos, e pode ser propagado em cultivos celulares de primatas. Outros vírus que pertencem ao gênero *Vesivirus* infectam primatas (*Pan-1*), bovinos (*Bos-1*), cetáceos (*Tor-1*) e répteis (*Cro-1*), e ilustram a diversidade de espécies que podem ser infectadas. Recentemente, o SMSV causou uma infecção em um laboratorista, adicionando assim os humanos em seu espectro de hospedeiros.

As características clínicas da infecção pelo SMSV são similares àquelas associadas com o VESV. Mamíferos marinhos infectados com o SMSV apresentam formações vesiculares nas partes mais frias do corpo, como as nadadeiras. A infecção pelo SMSV também tem sido associada com falhas reprodutivas e mortalidade neonatal. A infecção de suínos com o SMSV causa uma doença clinicamente indistinguível daquela causada pelo VESV.

5.2 Lagovírus (vírus da doença hemorrágica dos coelhos)

O lagovírus RHDV foi inicialmente isolado na China, em 1984, em um surto de doença de coelhos importados da Alemanha. Outros surtos foram subsequentemente relatados em outros países, e a sua etiologia foi inicialmente associada com carne de coelho importada da China. No entanto, o RHDV foi identificado na Europa em coelhos domésticos ao mesmo tempo em que foi detectado na população de coelhos silvestres, indicando que esse vírus já se encontrava presente no continente. No final da década de 1980, o RHDV foi identificado no México, mas foi rapidamente erradicado pela eliminação dos animais infectados. Por outro lado, um vírus isolado de lebres marrons (EBHSV), que causa sinais semelhantes ao RHDV, havia sido descrito anteriormente na Europa e poderia estar presente naquele continente desde 1976.

Esses vírus se disseminam pela via oral, nasal e transmissão parenteral. O vírus encontra-se presente nas secreções dos animais infectados. Embora existam evidências consistentes, até o presente, não se sabe, com certeza, se o EBHSV pode ser transmitido por insetos. Em um relato, os insetos foram incriminados como vetores de escape do vírus das ilhas Wardang, na costa da Austrália, onde esse vírus foi testado como um agente biológico para o controle de coelhos europeus. A partir da ilha de Wardang, insetos contendo o vírus podem ter sido transportados com o vento até o continente, onde o vírus ocasionou a infecção de coelhos em toda a Austrália. A disseminação do vírus causou a morte de 65 a 90% dos coelhos em algumas regiões.

A doença aguda causada pela infecção com o RHDV em coelhos europeus é caracterizada por anorexia e taquipnéia, convulsões e, ocasionalmente, secreção nasal sanguinolenta. A febre é comum no início da infecção, porém, nos estágios avançados, observa-se hipotermia. A infecção experimental geralmente causa a morte em 48-72 horas. A maioria dos principais órgãos internos é afetada: os pulmões, traquéia e rins apresentam hemorragias, enquanto o baço e o fígado apresentam-se aumentados de volume e com coloração vermelho-escura. A morte dos animais sobrevém a uma hepatite necrosante. Observa-se também coagulação intravascular disseminada. Coelhos com menos de quatro semanas de idade não apresentam sinais clínicos da infecção e geralmente sobrevivem. Lebres infectadas com o EBHSV apresentam sinais clínicos semelhantes àqueles da infecção pelo RHDV. A patogenia da infecção com o EBHSV, as manifestações clínicas e taxas de mortalidade são similares às observadas na infecção pelo RHDV.

5.3 Norovírus e sapovírus

Os calicivírus humanos são reconhecidos como importantes causas de gastroenterites, e a principal forma de transmissão é a via fecal-oral. Os norovírus e sapovírus produzem sinais clínicos indistinguíveis; no entanto, há diferenças na epidemiologia e imunologia. Os norovírus estão primariamente associados com doenças em crianças na idade escolar, além de adultos. Já os sapovírus infectam preferencialmente crianças mais novas e bebês. Os sapovírus induzem imunidade que pode prevenir reinfecções posteriores, enquanto os norovírus induzem imunidade de curta duração, e os indivíduos podem ser reinfectados.

Nos animais domésticos, os norovírus e os sapovírus podem eventualmente causar gastroenterite severa, mas podem, também, ser isolados de animais clinicamente sadios. A gastroenterite é caracterizada por um período relativamente curto de diarreia (2 a 3 dias), letargia e anorexia.

É possível que os animais domésticos de produção sejam os reservatórios dos calicivírus entéricos de humanos, existindo, portanto, a pos-

sibilidade de transmissão entre espécies. A caracterização molecular de calicivírus isolados de humanos e animais tem demonstrado uma grande similaridade. Recombinações genéticas já foram observadas nesses vírus e deram origem a novas variantes.

6 Diagnóstico e controle

O diagnóstico da infecção causada pelo calicivírus tem sido realizada pelo isolamento viral e por testes de soroneutralização (SN). O isolamento permite a multiplicação do vírus em cultivos de células susceptíveis, a partir de amostras clínicas. No entanto, o isolamento é restrito aos calicivírus que replicam em cultivos celulares, como o FCV, SMSV e VESV. Por outro lado, as infecções por todos os calicivírus podem ser diagnosticadas utilizando a SN para pesquisar anticorpos no soro de animais convalescentes. Testes de ELISA também têm sido utilizados para diagnosticar sorologicamente as infecções por calicivírus humanos e podem também ser adaptados para detectar antígenos virais em amostras clínicas. O uso do teste evita a necessidade de se realizar o isolamento e/ou SN, que são mais demorados e laboriosos.

A utilização da microscopia eletrônica de transmissão também tem sido utilizada extensivamente no diagnóstico das infecções por calicivírus. No entanto, essa técnica não é muito sensível e somente detecta amostras que possuam mais de um milhão de partículas virais por mililitro. Além disso, é necessário que as amostras sejam coletadas no pico da replicação viral, o que pode reduzir o tempo ideal de coleta para poucas horas.

Com a caracterização molecular de diversas cepas de calicivírus, testes de diagnóstico mais rápidos, sensíveis e baratos foram desenvolvidos. Os testes mais notáveis são aqueles baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). *Primers* para a PCR de todos os gêneros de calicivírus, têm sido descritos e podem ser utilizados para o diagnóstico.

Com exceção do calicivírus felino, não existem vacinas disponíveis para o VESV ou para os outros calicivírus animais.

7 Bibliografia consultada

GREEN, K.Y. et al. Taxonomy of the caliciviruses. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.S322-330, 2000.

HERBERT, T.P.; BRIERLEY, I.; BROWN, T.D. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. **The Journal of General Virology**, v.77, p.123-127, 1996.

HURLEY, K.E. et al. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p.241-249, 2004.

KREUTZ, L.C.; SEAL, B.S. The pathway of feline calicivirus entry. **Virus Research**, v.35, p.63-70, 1995.

KREUTZ, L.C.; JOHNSON, R.P.; SEAL, B.S. Phenotypic and genotypic variation of feline calicivirus during persistent infection in cats. **Veterinary Microbiology**, v.59, p.229-236, 1998.

NEILL, J.D. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. **Virus Research**, v.17, p.145-60, 1990.

NEILL, J.D.; MEYERS, R.F.; SEAL, B.S. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. **Journal of Virology**, v.69, p.4484-4488, 1995.

RADFORD, A.D. et al. The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.117, p.14-18, 2006.

1 Introdução	539
2 Classificação	540
3 Estrutura do vírion e do genoma	541
4 Replicação	543
5 Picornavírus de interesse veterinário	546
5.1 Vírus da febre aftosa	546
5.1.1 Situação da febre aftosa na América do Sul e Brasil	547
5.1.2 O agente	548
5.1.3 Epidemiologia	549
5.1.4 Patogenia, sinais clínicos e patologia	551
5.1.5 Imunidade	552
5.1.6 Diagnóstico	552
5.1.7 Controle e profilaxia	554
5.1.8 Vacinas	555
5.1.9 Perspectivas	556
5.2 Vírus da doença vesicular dos suínos	557
5.3 Enterovírus suíno tipo 1	558
5.4 Enterovírus suínos tipos 2-11	558
5.5 Enterovírus bovino	559
5.6 Rinovírus eqüino e bovino	559
5.7 Vírus da encefalomiocardite	559
5.8 Vírus da encefalomielite das aves	560
6 Bibliografia consultada	560

1 Introdução

A família *Picornaviridae* é uma das mais antigas e variadas famílias virais, abrangendo mais de 200 vírus classificados em nove gêneros. Esses vírus têm sido muito utilizados como modelos em pesquisas de diversos aspectos da Virologia. Os membros desta família – os picornavírus – são vírus pequenos, icosaédricos, sem envelope e possuem uma molécula de RNA linear de polaridade positiva como genoma. O nome da família é derivado de *pico* (pequeno) e RNA, em referência ao genoma de ácido ribonucleico. A família abriga importantes patógenos humanos e animais, como o poliovírus humano (agente da poliomielite ou paralisia infantil) e o vírus da febre aftosa (*foot and mouth disease virus*, FMDV).

Em 1897, Loeffler e Frosch apresentaram a descoberta inovadora de um agente filtrável como causa da febre aftosa (*foot and mouth disease*, FMD) e, em seguida, a primeira evidência de que uma doença animal poderia ser causada por um vírus. Em 1909, o poliovírus foi descrito como o agente etiológico da poliomielite humana por Landsteiner e Popper. Enders e colaboradores, em 1949, foram os primeiros a multiplicar o

poliovírus em células de mamíferos cultivadas *in vitro*, iniciando a era moderna dos cultivos celulares. Esta tecnologia levou ao desenvolvimento de duas vacinas altamente eficazes para a prevenção da poliomielite: a vacina inativada desenvolvida por Jonas Salk (1960) e a vacina atenuada desenvolvida por Albert Sabin (1973). Em 1981, o poliovírus tornou-se o primeiro vírus RNA a ter o seu genoma clonado e completamente seqüenciado. Em 1985, a estrutura tridimensional dos vírions de dois membros da família dos picornavírus: o poliovírus tipo 1 e o rinovírus tipo 14, foi resolvida por cristalografia, abrindo perspectivas para novas abordagens às terapias antivirais e vacinologia. Em 2002, vírions infecciosos foram produzidos a partir de cDNA sintetizado *in vitro*, utilizando deoxiligonucleotídeos complementares ao RNA do poliovírus.

Os picornavírus têm sido isolados de várias espécies de vertebrados, incluindo humanos, primatas não-humanos, cavalos, suínos, roedores e pássaros (Tabela 21.1). Os vírus pertencentes a esta família são responsáveis por enfermidades importantes em humanos, incluindo o resfriado (mais de 100 sorotipos de rinovírus), doenças do trato digestivo e do sistema nervoso central,

Tabela 21.1. Doenças causadas pelos principais picornavírus.

Vírus	Doença	Espécie
Poliovírus (PV)	poliomielite (meningite)	humanos
Coxsackie	resfriado, diarreia infantil, conjuntivite aguda	humanos
Hepatite A	hepatite tipo A	humanos e macacos
Echovírus	doença respiratória, encefalite	humanos
Rinovírus	resfriado	humanos, macacos
Febre aftosa (FMDV)	febre aftosa	bovinos, ovinos, caprinos, suínos
Rinovírus eqüino (EqRV)	doença respiratória aguda	eqüinos
Hepatite dos patos	hepatite dos patos	pato doméstico
Encefalomiocardite (EMCV)	miocardite, encefalite	suínos, roedores
Doença vesicular dos suínos (SVDV)	doença vesicular dos suínos	suínos
Enterovírus bovino (BEV)	associado com doença entérica e respiratória	bovinos

como meningites, encefalites e paralisia (vírus Coxsackie, echovírus e poliovírus), doença hepática (vírus da hepatite A) e infecção cardíaca (vírus Coxsackie).

Entre os picornavírus de interesse veterinário estão o vírus da febre aftosa (FMDV), o vírus da encefalomiocardite dos camundongos (EMCV), o enterovírus bovino (BEV) e o agente da doença vesicular dos suínos (SVDV). O protótipo da família é o poliovírus, agente etiológico da poliomielite em humanos. Esse vírus é o mais estudado em termos do ciclo replicativo, estrutura do vírion, interação com receptores virais, estrutura e função das proteínas virais e com relação aos mecanismos de expressão gênica. O FMDV é um dos principais vírus de animais, pela grande repercussão sanitária e econômica da infecção, sobretudo, devido às barreiras impostas ao comércio internacional de animais e subprodutos oriundos de áreas endêmicas ou de risco.

2 Classificação

Os picornavírus são atualmente subdivididos em nove gêneros: *Enterovirus* (vírus de suínos e símios), *Cardiovirus* (encefalomiocardite, EMCV e vírus de Theiler), *Rhinovirus* (rinovírus humano), *Hepatovirus* (vírus da hepatite A), *Erbovirus*, *Teschovirus* (vírus da polioencefalomielite dos suínos), *Aphthovirus* (FMDV e vírus da rinite eqüina) e *Parechovirus* (antigo echovírus 22 e 23). Curiosamente, os picornavírus de diferentes gêneros possuem homologia de nucleotídeos inferior a 45% entre si (menos de 34% de similaridade

em nível de aminoácidos). Por exemplo, os enterovírus humanos que apresentam 111 sorotipos são divididos em quatro grupos genéticos (A, B, C e D).

Até recentemente, cada sorotipo de picornavírus era designado como uma espécie viral separada. A nova definição adota a seguinte regra: “uma espécie de picornavírus é” uma classe ou grupo taxonômico (*polythetic*) de sorotipos relacionados filogeneticamente ou isolados que compartilham: a) uma limitada abrangência de hospedeiros e receptores celulares; b) um grau significativo de compatibilidade nos processos proteolíticos, replicação, montagem e recombinação genética; c) mapas genômicos essencialmente idênticos. Logo, a classificação atual é baseada em diversos parâmetros, incluindo morfologia, organização genômica, estratégias de replicação, padrões de clivagem de proteínas e identidade genética.

Com base nesses critérios, alguns enterovírus foram reclassificados do gênero *Enterovirus* para formar os gêneros *Hepatovirus* e *Parechovirus*. Os enterovírus e hepatovírus, que infectam os hospedeiros via trato digestivo, são altamente resistentes ao pH baixo do estômago e a enzimas proteolíticas do trato digestivo. Por outro lado, os rinovírus e outros vírus que replicam no trato respiratório são lábeis em ambientes ácidos (Tabela 21.2). A característica de instabilidade a pH inferior a 7,0 do FMDV resulta em diferenças no desnudamento durante a infecção de células de cultivo, comparado com outros picornavírus, e, provavelmente, também interfere em termos de especificidade tecidual e órgãos alvos nos hospedeiros.

Tabela 21.2. Propriedades físico-químicas dos picornavírus.

Gênero	Estabilidade ao pH	Densidade Buoyant	Coefficiente de sedimentação
<i>Aphthovirus</i>	Lábil, < 7	1,43 - 1,45	142 - 146S
<i>Cardiovirus</i>	Estável, 3 - 9	1,34	160S
<i>Enterovirus</i>	Estável, 3 - 9	1,34	160S
<i>Hepatovirus</i>	Estável	1,34	160S
<i>Rhinovirus</i>	Lábil, < 6	1,40	160S

3 Estrutura do vírion e do genoma

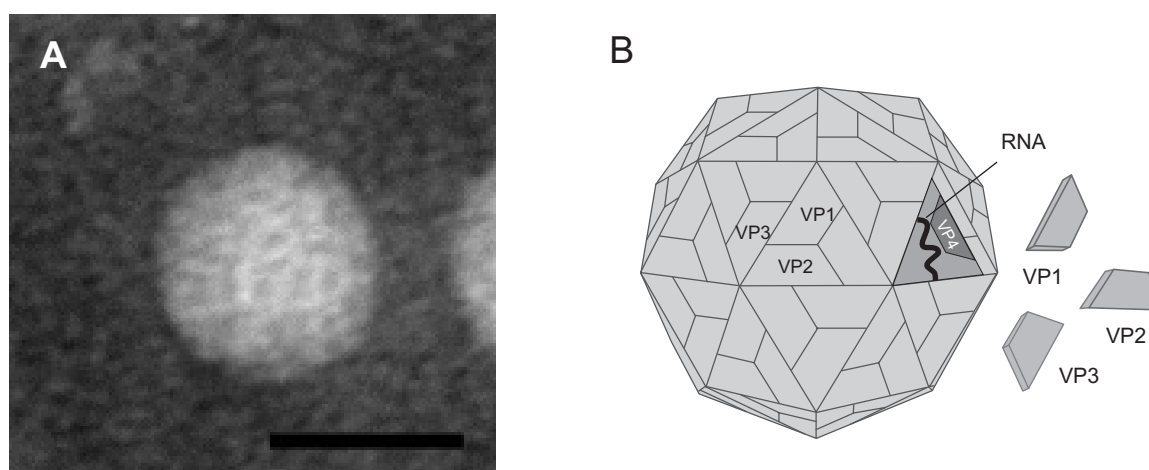
As partículas víricas dos picornavírus são icosaédricas (25-30 nm de diâmetro), sem envelope e contêm uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva como genoma. O capsídeo possui uma superfície externa regular, é perfeitamente simétrico, e é composto por 60 unidades estruturais. Cada uma dessas unidades, denominadas protômero, é formada por uma cópia das quatro proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4 (Figura 21.1). Essas proteínas são produzidas pela clivagem enzimática de uma poliproteína precursora (P1). As proteínas são estáveis e protegem o genoma de ambientes hostis, proporcionando um meio de transmitir o genoma entre células e entre hospedeiros. Os vírions dessa família são resistentes ao éter, clorofórmio e álcool, porém a radiação iônica, o fenol e formaldeídos inativam o vírus rapidamente. A estabilidade dos picornavírus sob condições ambientais desempenha um papel importante na epidemiologia e nas formas de controle das doenças a eles associadas.

A sequência de aminoácidos que constituem as proteínas estruturais, bem como a conformação e as relações entre elas formam estruturas onde se localizam os receptores *canyons* nos poliovírus e *loops* nos aftovírus. Essas sequências são determinantes do tipo celular que pode ser

infectado, portanto, possuem influência direta no tropismo e patogenicidade viral. Além da determinação do *host range in vitro* e *in vivo*, esses sítios, juntamente com outras regiões do capsídeo, são altamente antigênicos e são alvos de anticorpos do hospedeiro. A variabilidade dessas regiões – e conseqüentemente a sua reatividade sorológica – determina a diferenciação dos vírus em sorotipos e subtipos.

O genoma dos picornavírus é uma molécula de RNA de fita simples, polaridade positiva e possui entre 7 e 8,5 kb (dependendo da espécie viral). O RNA genômico possui uma proteína denominada VPg (3B) covalentemente ligada na sua extremidade 5', e uma cauda poliA na extremidade 3' (Figura 21.2). Pelo fato de possuir polaridade positiva e poder ser traduzido diretamente pelos ribossomos, o RNA genômico é infeccioso quando introduzido artificialmente em células permissivas.

O RNA genômico e os RNA mensageiros (mRNAs) dos picornavírus não possuem *cap* na extremidade 5'. Por isso, a sua tradução depende do reconhecimento pelos ribossomos por meio de um mecanismo diferente dos mRNAs celulares. Os RNAs virais são reconhecidos pelos ribossomos através de uma estrutura secundária localizada na região não-traduzida (*untranslated region* – 5'UTR) denominada sítio interno de



Fonte: A) Dr Thomas Burrage, USDA, PIADC. B) Adaptada de Flint et al. (2000).

Figura 21.1. Partículas víricas da família *Picornaviridae*. A) Fotos de microscopia eletrônica de vírions do FMDV em coloração negativa. B) Representação esquemática do vírion e seus componentes.

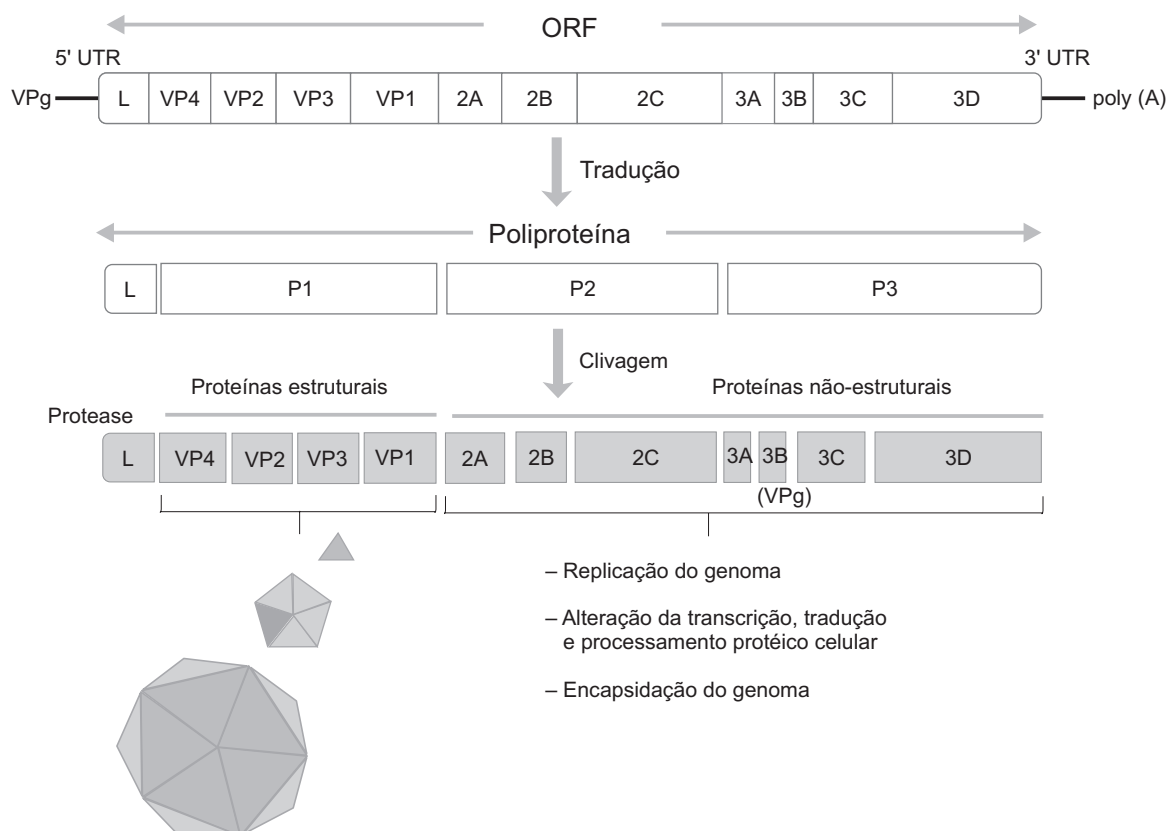


Figura 21.2. Organização do genoma do vírus da febre aftosa (FMDV), mostrando os componentes do RNA (linha), os genes e os produtos primários da tradução (retângulos em branco) e os produtos finais da clivagem (retângulos em cinza). A função das proteínas está resumida abaixo da figura.

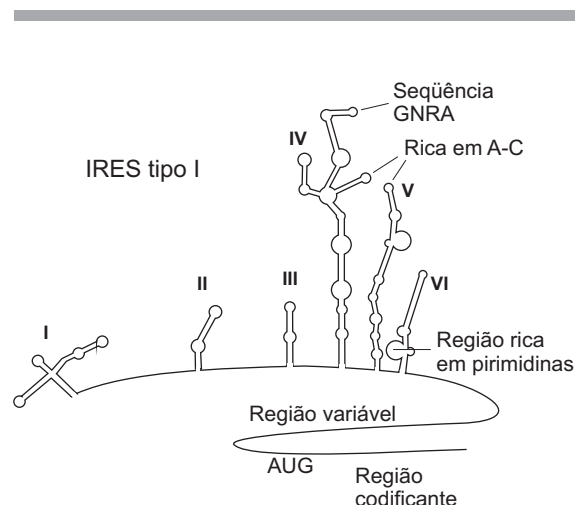
entrada dos ribossomos (*internal ribosomal entry site* – IRES). Próximo à extremidade 5', existe uma longa região não-traduzida (5'UTR), que varia entre 740-1.300 nt, precedendo o códon de iniciação da única e longa sequência aberta de leitura (*open reading frame*, ORF). A região 5'UTR possui função na tradução, influi na virulência e, possivelmente, desempenhe alguma função na morfogênese das partículas víricas. Próximo à extremidade 3', existe outra região não-traduzida (50-100 bases, 3'UTR) que contém sítios importantes para a replicação do genoma e infecções produtivas (Figura 21.2).

A 5'UTR do FMDV apresenta mais de 1.300 nt de extensão e é muito maior do que aquelas presentes no genoma dos enterovírus e poliovírus (740 bases) ou dos cardiovírus e EMCV (850 bases). A 5'UTR dos aftovírus contém um segmento curto, conhecido como fragmento S (apro-

ximadamente 350 bases), seguido por mais de 100 bases, contendo aproximadamente 90% de citosina, com um número pequeno de uracilas (U) e adeninas (A) (poliC). O fragmento S e poliC são seguidos por um segmento de RNA de mais de 700 nt, que pode formar estruturas secundárias altamente conservadas. Essas estruturas incluem *pseudoknots* (PKs) repetidos em linha, um elemento *cis-acting* envolvido na replicação do RNA (*cre*) e uma estrutura relacionada com a iniciação da tradução (IRES). O elemento IRES nos aftovírus possui aproximadamente 450 nucleotídeos e contém duas regiões ricas em pirimidinas imediatamente anteriores a cada códon de iniciação alternativo. O fragmento S, a sequência poliC e as estruturas PK ocupam as primeiras 600 bases do genoma do FMDV, enquanto uma pequena estrutura na forma de trevo, com cerca de 100 nucleotídeos (ou menos), é encontrada no genoma

dos enterovírus. Como esta estrutura em forma de trevo tem sido descrita relacionada à replicação do RNA de vários picornavírus, inclusive o poliovírus, provavelmente o fragmento S, poliC e PKs dos aftovírus podem também apresentar função na replicação do genoma do FMDV.

Os elementos IRES do genoma dos picornavírus são divididos em três grupos, de acordo com diferenças nas estruturas secundária e terciária altamente conservadas. O IRES do grupo 1 é encontrado no genoma dos enterovírus e rinovírus; do grupo 2 é presente nos aftovírus e cardiovírus, e os hepatovírus possuem o IRES do grupo 3. Dentro de cada grupo há um grau maior de conservação das estruturas secundárias do que da sequência de nucleotídeos propriamente dita. Todos os elementos IRES dos picornavírus apresentam uma região rica em pirimidinas próxima ao códon de iniciação (Figura 21.3).



Fonte: adaptada de Rueckert (1996).

Figura 21.3. Estruturas secundárias do RNA genômico dos picornavírus que formam os IRES (sítios internos de entrada para os ribossomos). Um IRES do tipo I é representado na figura.

O RNA genômico possui uma única e longa ORF, cuja tradução resulta em uma poliproteína de, aproximadamente, 2.400 aminoácidos. Essa poliproteína é clivada à medida que vai sendo produzida, originando os precursores das proteínas estruturais e não-estruturais (ver Figura 21.2). A poliproteína contém uma região que origina as proteínas do capsídeo (P1) e por duas regiões que originam as proteínas não-estruturais (P2 e P3).

As proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação do genoma e no processamento da poliproteína.

A clivagem inicial da poliproteína é executada pela proteinase 2A^{pro} no sítio P1/P2. Nos aftovírus e cardiovírus, esta clivagem ocorre na junção P1 2A/2B pela 2A^{pro} e, no sítio P1/P2, pela L^{pro}. A maioria das outras clivagens é mediada pela atividade da protease 3C^{pro} e seu precursor 3CD^{pro}.

4 Replicação

A primeira etapa no ciclo replicativo dos picornavírus é a interação dos vírions com os receptores celulares. Os receptores são determinantes do tropismo tecidual, tendo uma influência fundamental na patogenia da doença. Cada grupo de vírus ou até mesmo cada vírus apresenta um mecanismo de penetração único. Alguns picornavírus (FMDV e rinovírus) são internalizados por endocitose, e a penetração do genoma ocorre a partir da vesícula endocítica acidificada. No poliovírus e, provavelmente, em alguns outros, a penetração ocorre na membrana plasmática, sem a necessidade de internalização. Tem sido proposto que a VP1 do poliovírus penetraria na membrana, formando poros através dos quais o genoma seria ejetado para o interior da célula. Essa atividade da VP1 é dependente de sua ligação ao receptor, que provoca alterações na sua estrutura. Nos vírus que são internalizados por endocitose, o processo de internalização é acompanhado de uma série de alterações conformacionais no capsídeo viral, levando ao desnudamento e à liberação do genoma no citoplasma celular.

Durante as últimas duas décadas, várias moléculas de superfície celular foram identificadas como receptores para os picornavírus. A maioria desses receptores pertence à superfamília das imunoglobulinas (Ig), incluindo o VCAM-1, ICAM-1, CAR e CD155 (receptor de poliovírus), e à superfamília das integrinas, como $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha \nu \beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 6$, $\alpha \nu \beta 8$ (parechovírus humano 1 [hPEV1], echovírus 1, aftovírus e alguns enterovírus como o Coxsackie A9 [CAV9]). Outros receptores, como os similares ao SCR (*decay-accelerating factor* [DAF]) e moléculas LDL (VLDL-R), são também utilizados.

Nos vírions dos poliovírus e rinovírus, os sítios de ligação aos receptores são os *canyons*. Mutações nesses locais reduzem ou abolem a sua capacidade de se ligar à superfície celular. No entanto, os capsídeos do FMDV e vírus Coxsackie A9 não possuem depressões ou *canyons* proeminentes. Esses vírus se ligam aos receptores através de *loops* específicos, localizados na VP1. No FMDV, foi demonstrado que uma sequência R-G-D (arginina – glicina – asparagina) é responsável pela ligação às moléculas de integrinas que servem de receptores. Mutações nesta sequência reduzem drasticamente ou previnem a ligação dos vírions aos receptores. O vírus Coxsackie A9 também utiliza uma sequência idêntica na VP1 para interagir com os receptores. Porém, mutações nessa trinca de aminoácidos não impedem que o vírus se ligue à superfície celular, sugerindo a existência de outros receptores.

O ciclo de replicação dos picornavírus ocorre integralmente no citoplasma das células hospedeiras (Figura 21.4). O RNA genômico serve como molde para a tradução e para a replicação, resultando em uma interação complexa entre fatores de tradução do hospedeiro e de replicação do RNA. Para isso, a tradução e síntese de RNA fita negativa (intermediário replicativo) dos poliovírus são coordenadas pela interação de um complexo de fatores virais e celulares. Isso ocorre em pequenas vesículas, originadas a partir de membranas celulares, nas quais as proteínas não-estruturais do vírus ficam associadas.

Após o desnudamento e liberação no citoplasma, o RNA viral é traduzido diretamente pelos polirribossomos. O IRES forma uma estrutura secundária complexa que serve de sítio de ligação para os ribossomos, ou seja, o reconhecimento do RNA é independente de *cap*, ao contrário do que ocorre com os mRNAs celulares. A seguir, os ribossomos são direcionados ao códon de iniciação da tradução, sem a necessidade de escanear as sequências anteriores, como ocorre nos mRNAs que possuem *cap*. A tradução da ORF resulta em uma poliproteína, que é rapidamente clivada nos precursores P1, P2 e P3 e, em seguida, origina as proteínas individuais. As proteínas não-estruturais possuem papel importante na replicação do genoma e em funções relacionadas.

A replicação do RNA ocorre após alguns ciclos de tradução e maturação das proteínas. A replicação ocorre em duas etapas, e é realizada pela polimerase RNA dependente de RNA ($3D^{pol}$), com o auxílio de proteínas virais e celulares. O RNA genômico é inicialmente transcrito em moléculas complementares (sentido negativo), que são usadas como molde para a síntese de múltiplas cópias de RNA genômico. Dentre estes, alguns são traduzidos em proteína, enquanto outros serão incluídos nas partículas virais (Figura 21.4).

Embora as etapas básicas da replicação sejam razoavelmente conhecidas, pouco se conhece sobre os detalhes desses processos e sobre as funções das sequências e estruturas *cis-acting* contidas no RNA dos picornavírus. Duas questões ainda não esclarecidas se referem à síntese da cadeia negativa e ao modo como a polimerase viral reconhece o RNA viral entre os outros mRNA poliadenilados celulares.

Devido à ausência de atividade de correção da polimerase $3D^{pol}$, erros são frequentemente produzidos durante a replicação, resultando na incorporação de nucleotídeos incorretos. Em razão disso, cada novo genoma contém aproximadamente uma mutação. Logo, a população de RNA viral consiste de *quasispecies*, uma coleção de membros geneticamente diferentes, que podem se adaptar rapidamente a novos ambientes por seleção.

As etapas finais do ciclo replicativo envolvem a montagem dos capsídeos e a maturação dos vírions por clivagem da VP0 em VP2 e VP4. Os mecanismos de montagem e maturação ainda necessitam maior entendimento. Em termos gerais, os produtos da clivagem da região P1 pela $3C^{pro}$ são organizados em uma estrutura protômera, contendo uma cópia das proteínas VP0 (VP2 e VP4), VP1 e VP3. Cinco protômeros podem formar pentâmeros, e doze pentâmeros formam o capsídeo. Partículas intermediárias têm sido identificadas em células infectadas por picornavírus, incluindo protômeros, pentâmeros, partículas contendo RNA e com uma VP0 não clivada e, ainda, partículas com a VP0 não-clivada e sem o RNA (capsídeo vazio). O ciclo replicativo dos picornavírus está ilustrado na Figura 21.4.

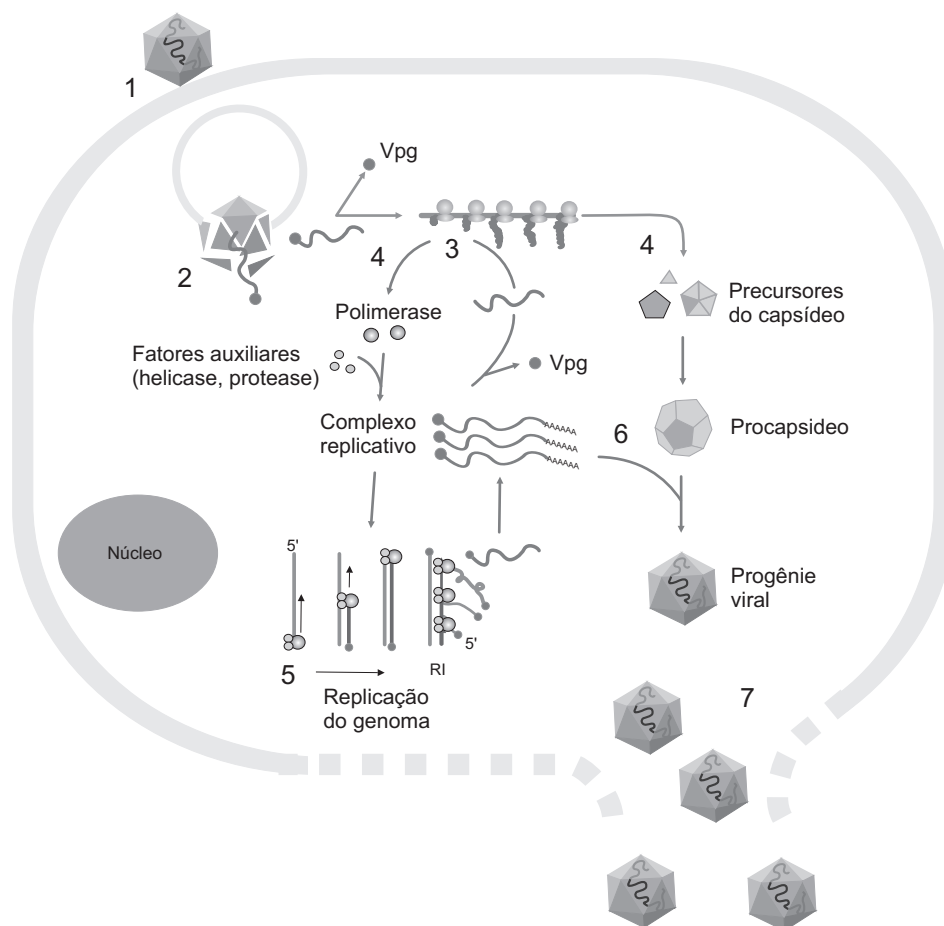


Figura 21.4. Ciclo replicativo dos picornavírus. 1) Ligação aos receptores; 2) Penetração; 3) Tradução do RNA genômico; 4) Clivagem dos precursores proteicos; 5) Replicação do genoma, via produção de um RNA intermediário (complementar); 6) Morfogênese; 7) Egresso por lise celular.

A competição dos RNA virais (sem *cap*) com os mRNA celulares (com *cap*), no momento da tradução, resultaria em desvantagem para o vírus. No entanto, os picornavírus possuem um mecanismo pelo qual podem assegurar a tradução dos seus mRNA em detrimento da tradução dos mRNAs celulares. Uma protease viral cliva fatores celulares necessários para a tradução dependente de *cap*, que é o mecanismo utilizado pela célula para traduzir os seus mRNAs. Nos poliovírus e rinovírus, a clivagem do fator de iniciação da tradução eIF4G pela protease 2A^{pro} impede a formação do complexo de tradução na extremidade 5' com *cap*. No FMDV, a clivagem é realizada pela protease L (líder). Assim, na impossibilidade de realizar a tradução convencional, a maquinaria celular passa a traduzir mRNAs que possuem outras estruturas para o reconhecimento pelos

ribossomos. Como foi visto, os RNAs dos picornavírus possuem a estrutura IRES, que permite que os ribossomos se liguem ao RNA e iniciem a tradução. A tradução direcionada pelo IRES é altamente eficiente e rápida, fazendo com que o ciclo de replicação seja completado em poucas horas (~3-5 horas) e com que uma célula infectada possa produzir até 10⁶ partículas víricas. Esse mecanismo faz com que a infecção pelos picornavírus resulte em inibição da síntese protéica celular. Já com duas horas de infecção, a tradução de mRNA celulares está praticamente parada, sendo substituída pela tradução de mRNAs virais.

Uma característica marcante dos picornavírus é a sua alta capacidade citolítica em células de cultivo. As alterações morfológicas das células iniciam com arredondamento celular, aumento da refratilidade, retração, picnose nuclear, dege-

neração e desprendimento das células da monocamada. Um pequeno número de partículas é suficiente para formar um foco infeccioso no tapete celular, que geralmente começa entre um e sete dias após a infecção. Quando presente em grandes concentrações, os picornavírus podem causar a lise completa da monocamada em poucas horas. Alguns vírus necessitam um período de adaptação para produzirem os efeitos citopáticos característicos. Nenhum cultivo celular é capaz de suportar a replicação de todos os picornavírus. Geralmente, utilizam-se células de origem humana ou de primatas não-humanos para os vírus que infectam humanos; e células da espécie hospedeira para a propagação dos vírus de interesse veterinário.

Alguns animais de laboratório são susceptíveis à infecção pelos picornavírus e a sua infecção experimental consegue reproduzir alguns aspectos da infecção. Alguns dos vírus dessa família (poliovírus, Cocksackie e alguns enterovírus) podem ser inoculados experimentalmente em primatas não-humanos e camundongos. Os vírus de interesse veterinário, como o FMDV, podem ser inoculados em espécies susceptíveis, como suínos ou bovinos, e também em animais de laboratório, como as cobaias e os camundongos lactentes.

5 Picornavírus de interesse veterinário

A seguir serão descritas as principais enfermidades causadas pelos membros da família *Picornaviridae* que possuem interesse veterinário. A enfermidade de maior destaque é a febre aftosa, seguida da doença vesicular dos suínos. A febre aftosa (FMD) é a enfermidade animal que possui maior repercussão em nível mundial, devido a sua alta infecciosidade e contagiosidade, perdas na produtividade e prejuízos econômicos por causa dos embargos comerciais. A doença vesicular dos suínos, por ser confundível com a febre aftosa, também possui certa importância. Porém, a sua ocorrência restrita a determinadas regiões faz com tenha uma importância reduzida no cenário mundial. Os outros vírus possuem menor importância clínica e, assim, serão abordados

com brevidade. Para informações mais completas, recomenda-se a literatura específica.

5.1 Vírus da febre aftosa

O primeiro registro descrevendo a febre aftosa (FMD) foi realizado por Fracastorius, na região de Verona, Itália, em 1546. A demonstração do agente causal deve-se a Loeffler e Frosch, em 1897, que, pela primeira vez, demonstraram que uma doença animal poderia ser causada por um agente filtrável, ou seja, por um vírus. No princípio do século 19, a FMD encontrava-se disseminada nos rebanhos bovinos da Europa, e isso estimulou o início das investigações sobre o vírus. Juntamente com o poliovírus humano, o FMDV é um dos picornavírus mais estudados. Os trabalhos iniciais objetivaram a caracterização de diferentes isolados, identificação de sorotipos, reprodução da enfermidade em animais de laboratório e desenvolvimento de vacinas.

O FMDV é notável por sua transmissibilidade extremamente alta entre animais, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e outros biungulados selvagens; assim como por sua ampla distribuição geográfica. A doença é caracterizada por alta morbidade, podendo causar mortalidade em animais jovens e perdas produtivas severas em adultos. As perdas diretas referem-se à queda na produção, principalmente em bovinos leiteiros e suínos. As perdas indiretas relacionam-se com a restrição ao comércio internacional de animais vivos e subprodutos, e com o impacto social, causado pelas ações de controle da infecção. A situação epidemiológica do FMDV no mundo reflete o nível de desenvolvimento econômico de cada região. O vírus encontra-se erradicado da Europa, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia. Os países da América do Sul apresentam surtos esporádicos, com maior ou menor frequência, dependendo do país. A infecção é endêmica na maioria dos países da África e Ásia (Tabela 21.3).

A implementação de programas de vacinação em massa contra o FMDV, após a Segunda Guerra Mundial, resultou em sucesso na erradicação da doença da Europa Ocidental e região

Tabela 21.3. Distribuição mundial do vírus da febre aftosa.

Região	Sorotipo presente
Oceania	Área livre
América do Norte	Área livre
América Central e Caribe	Área livre
América do Sul	A, O e C
África	SAT1, 2, 3, A, O, C
Ásia	A, O, C, Ásia1

Sul da América do Sul. Alguns países ou regiões nunca registraram a presença do agente (Austrália e Nova Zelândia), e outros conseguiram erradicar e se manter livres da enfermidade por longos períodos de tempo. A FMD foi descrita, pela última vez, em 1929, nos EUA; em 1952, no Canadá e, em 1954, no México. A vacinação massiva dos rebanhos bovinos na Europa e região Sul da América do Sul, durante muitos anos, resultou no controle da enfermidade e, por fim, na virtual erradicação do vírus. Essa situação gerou uma idéia de controle da enfermidade, e a vacinação foi descontinuada. Após alguns anos da interrupção dos programas de imunização, criou-se uma situação epidemiológica perigosa. Populações bovinas completamente susceptíveis ao agente, deterioração dos serviços veterinários de emergência e falta de conscientização dos produtores e público em geral, aliados com o intenso movimento de pessoas e à abertura de fronteiras comerciais entre países e regiões, proporcionou a disseminação do vírus entre rebanhos e regiões, alterando consideravelmente o mapa da distribuição da doença no mundo nos últimos dez anos. Como exemplos, podem ser citados os surtos de FMDV em Taiwan (1997), Brasil (2000-2001), Argentina (2001), Uruguai (2001), Reino Unido (2001) e Holanda (2001). Um surto de FMD pode custar milhões de dólares em perdas de produção e de animais, movimentação de animais e subprodutos, restrição a mercados consumidores e de exportação, afetando a estabilidade e a economia da região. A importância de outras doenças vesiculares em bovinos deve-se,

sobretudo, à sua semelhança clínica com a FMD e à necessidade de diagnóstico diferencial.

No início do mês de agosto de 2007, foi diagnosticado um surto de FMD na região de Surrey, Inglaterra. A identificação da amostra viral recuperada dos bovinos afetados indicou a presença do FMDV tipo O1 BFS. Essa amostra foi originalmente isolada na epidemia de 1967 no Reino Unido e, desde então, não havia sido mais identificada circulando em qualquer região do mundo, estando restrita ao uso laboratorial. As evidências sugerem que esse surto originou-se de um escape accidental ou intencional do Instituto de Saúde Animal (Institute of Animal Health, WHO/FAO) em Pirbright, ou de uma companhia de produtos veterinários que utiliza parte das instalações para a produção de vacinas. Durante o mês de julho de 2007, essa amostra foi utilizada no laboratório de Pirbright em testes de diagnóstico e na produção de vacinas. Após a confirmação do surto, as autoridades adotaram medidas severas de controle e movimentação animal, com o objetivo de conter o surto e evitar a disseminação para outras áreas do país.

5.1.1 Situação da febre aftosa na América do Sul e Brasil

O primeiro registro da presença do FMDV no continente americano foi realizado, em 1870, nos Estados Unidos, e, posteriormente, na província de Buenos Aires, Argentina (1865, 1867 e 1870), Uruguai (1870), Chile (1871) e, no Brasil, nos estados do Rio Grande Sul e Minas Gerais (1895). No início do século 20, a enfermidade disseminou-se para outros estados brasileiros e para outros países na América do Sul. Na década de 1950, foi criada uma organização denominada PANAFTOSA, ligada à Organização Pan-Americana de Saúde, com o objetivo de coordenar as ações de controle, diagnóstico e prevenção da FMD na América do Sul.

Desde a década de 1950, quando os programas de controle do FMDV iniciaram, muitos progressos foram obtidos. O primeiro país da América do Sul a obter a condição de área livre do FMDV sem vacinação, reconhecido pela OIE, foi o Chile, em 1988, e, desde então, não tem registrado a presença do agente. A decisão da União

Européia (EU) em interromper a vacinação no princípio dos anos 1990 estimulou países como Argentina, Uruguai e região Sul do Brasil a intensificarem o combate à enfermidade para terem acesso ao mercado consumidor europeu. Como resultado de intensos programas de prevenção e controle, o Uruguai (em 1994), a Argentina e Paraguai (em 1997) e os estados brasileiros do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (em 1998) obtiveram da OIE a condição de áreas livres do FMDV com vacinação. Essa situação progrediu para vários outros estados brasileiros nos anos seguintes, resultando em uma população de aproximadamente 190 milhões de bovinos livres do vírus na região Sul da América do Sul.

O maior objetivo da região era a obtenção a condição de área livre de FMDV sem vacinação, situação que favoreceria a abertura de mercados livres da enfermidade. O Uruguai interrompeu a vacinação, em 1994, e obteve junto a OIE a condição de país livre sem vacinação em 1996. Seguindo esse procedimento, a Argentina e o Paraguai interromperam a vacinação em 1999, e os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina em 2000.

A euforia com a possível erradicação do agente da região Sul da América do Sul foi seguida de acontecimentos que possibilitaram a formação de uma imensa população bovina totalmente susceptível. Alguns dos fatores que contribuíram para essa situação foram: a) progressiva perda da proteção de uma grande população em um curto período de tempo; b) movimentação de um grande número de animais entre as regiões; c) presença de áreas endêmicas em algumas regiões do continente; d) deficiência na prevenção sanitária; e) substancial redução da infra-estrutura veterinária para ações de controle, prevenção, diagnóstico e educação; f) subavaliação dos riscos de reintrodução do vírus; g) prevalência dos interesses políticos e comerciais sobre os requerimentos sanitários; h) omissão nos cumprimentos dos procedimentos e normas do Código Internacional de Saúde Animal da OIE, bem como falta de transparência e veracidade na informação da situação sanitária de alguns países. Ou seja, em um curto período de tempo, toda a infra-estrutura sanitária foi enfraquecida, perdendo a capaci-

dade de desenvolver ações de prevenção e controle da enfermidade.

Nos anos que se seguiram à obtenção da condição de zona livre de FMDV, a região sul da América do Sul presenciou a reemergência do agente em diversos países ou estados (Tabela 21.4). Alguns países da América do Sul (Equador, Bolívia, Venezuela, Norte do Brasil, algumas regiões da Colômbia), onde a exploração bovina com fins de exportação é inexpressiva, o combate à enfermidade não é prioritário, perpetuando áreas endêmicas ou de situação desconhecida. Esforços governamentais têm sido feitos com o objetivo de conscientizar a região da gravidade do problema e para que medidas de combate sejam adotadas por todos os países.

5.1.2 O agente

O FMDV pertence ao gênero *Aphthovirus*, apresentando sete sorotipos (A, O, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 e Ásia 1). Cada tipo possui um amplo número de subtipos antigenicamente relacionados, porém diferenciáveis sorologicamente. Os tipos e sorotipos produzem doença clinicamente indistinguível, porém apresentam diferentes distribuições geográficas e situações epidemiológicas. Por exemplo, os sorotipos SAT-1, SAT-2 e SAT-3 nunca se difundiram além do continente africano. Outro exemplo é o FMDV tipo C, que permaneceu oculto durante muitos anos, sendo quase considerado extinto, até que ressurgiu em um surto da região Amazônica do Brasil em 2004. Algumas variações de virulência entre sorotipos e subtipos podem ser observadas. Após a infecção com um determinado sorotipo, o animal estará protegido contra a infecção pelo mesmo sorotipo, mas permanece susceptível à infecção por um sorotipo diferente. Ou seja, não há proteção cruzada entre os diferentes sorotipos, em razão das diferenças antigênicas entre eles. A diferença antigênica entre subtipos dentro de um tipo pode ser acentuada em alguns casos, e os níveis de neutralização cruzada podem ser insuficientes para conferir proteção. Essa situação pode resultar em comprometimento da eficácia das vacinas.

Tabela 21.4. Surtos de febre aftosa diagnosticados na América do Sul e notificados à OIE durante os anos de 2000 a 2006.

	País	Estado/Província	Espécie	Sorotipo
2000	Paraguai		Bovinos	FMDV A
	Argentina	Formosa	Bovinos	FMDV O
	Brasil	Rio Grande do Sul	Bovinos	FMDV O
	Colômbia	Antiquóia	Bovinos	FMDV O
	Uruguai	Artigas	Suínos e bovinos	FMDV O
2001	Argentina	Buenos Aires	Bovinos	FMDV A
	Uruguai	Soriano	Bovinos	FMDV A
	Brasil	Rio Grande do Sul	Bovinos	FMDV A
2002	Paraguai	Canindé	Bovinos	FMDV O
	Venezuela		Bovinos	FMDV O
2003	Bolívia	Chuquisaca	Bovinos	FMDV O
	Paraguai	Boqueron	Bovinos	FMDV A e O
	Bolívia	La Paz	Bovinos	FMDV O
	Argentina	Salta	Suínos e bovinos	FMDV O
2004	Peru	Lima	Bovinos	FMDV O
	Brasil	Pará	Bovinos	FMDV O
	Colômbia	Santander	Bovinos	FMDV A
	Brasil	Amazonas	Bovinos	FMDV C
2005	Colômbia	Bogotá	Bovinos	FMDV A
	Equador	Manibi	Bovinos	FMDV O
	Brasil	Mato Grosso do Sul	Bovinos	FMDV O
2006	Argentina	Corrientes	Bovinos	FMDV A
	Brasil	M. Grosso do Sul e Paraná	Bovinos	FMDV O
	Equador	Esmeralda	Bovinos	???
	Brasil	M. Grosso do Sul	Bovinos	FMDV O
	Equador	Pichincha	Bovinos e búfalos	FMDV O

5.1.3 Epidemiologia

A transmissão do FMDV entre os animais pode ocorrer de várias formas. As principais são a transmissão direta pelo contato de animais susceptíveis com animais infectados e por contato indireto, pelo contato dos animais com fômites ou subprodutos contaminados. A disseminação ocorre pelo contato com secreções e excreções oriundas de animais infectados, transporte de animais, em exposições, feiras, remates, entre outras. A disseminação indireta pode ocorrer por meio de pessoas (trabalhadores, produtores

e veterinários), veículos, vestuário, equipamentos, sobras de alimentos usados para alimentação de animais, principalmente suínos. A persistência do vírus no meio ambiente está relacionada com as condições ambientais. Embora o FMDV seja sensível a influências ambientais, como pH abaixo de 6,5, radiação solar e dessecação, o vírus pode sobreviver por longos períodos sob baixas temperaturas e em locais com relativa umidade.

Durante a infecção, o vírus é excretado nos tecidos e fluidos das lesões, na saliva, ar expirado, secreções nasais, sangue, leite, sêmen e urina. A excreção viral nas secreções e excreções inicia

geralmente 24 horas antes do aparecimento dos sinais clínicos, diminuindo consideravelmente até cinco a sete dias após o desenvolvimento das lesões. Quando os sinais clínicos se tornam bem evidentes, a excreção viral já está reduzida. A redução nos títulos de vírus excretados coincide com o surgimento e aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes. O pico da excreção em bovinos, suínos e ovinos pode ocorrer antes do aparecimento dos sinais clínicos. Os suínos são os grandes disseminadores do vírus através de aerossóis; os bovinos são bastante sensíveis a infecção pelo trato respiratório, e os ovinos podem ser considerados os eliminadores silenciosos, pois as lesões são muito discretas.

Em bovinos, 10-30 gramas de material oriundos de uma vesícula da língua freqüentemente contém mais de 1 bilhão de unidades infectantes do vírus. Um bovino adulto pode facilmente excretar mais de 10^{14} partículas virais por dia. Essa grande quantidade de vírus produzida e excretada irá se disseminar no ambiente e aderir aos equipamentos, materiais orgânicos e inorgânicos, ambiente, animais e pessoas, que servem de veículos para a transmissão do agente.

Após a manipulação de animais doentes ou no contato com secreções, excreções, manipulação de equipamentos, utensílios e restos mortais de animais, o vírus pode permanecer nas roupas e sapatos das pessoas e, dessa forma, ser disseminado para animais susceptíveis. Casos em que o homem (trabalhadores, produtores e veterinários) carregou mecanicamente o vírus já foram bem descritos e caracterizados. A presença viral nas secreções oronasais de pessoas que manipularam animais infectados pode ser observada por até 48 horas pós-exposição. A quantidade de vírus reduz consideravelmente com o tempo, e nunca foi possível comprovar a transmissão do vírus presente nessas secreções para animais. O sucesso na transmissão do vírus presente nessas secreções estaria diretamente relacionado com a distância e com o tempo de exposição do animal. Na literatura, existem algumas descrições da infecção de humanos com o FMDV. Geralmente esses casos estão relacionados com pessoas que manipularam grandes concentrações do vírus e desenvolveram algum tipo de lesão clínica, po-

rém nunca foi comprovado o envolvimento do FMDV como agente causal.

O FMDV é excretado em grande quantidade no ar expirado pelos animais, principalmente os suínos. A transmissão por aerossóis pode ocorrer e está diretamente relacionada com a quantidade e concentração de aerossóis produzidos e com a distância entre os animais. Condições ambientais como umidade, temperatura, ventos, pH do ambiente e tamanho das partículas são determinantes neste tipo de transmissão. No surto do Reino Unido de 1967-1968, a associação dos dados epidemiológicos com as condições meteorológicas indicou uma possível disseminação pelo vento. No continente africano e em regiões tropicais, onde as condições meteorológicas são de calor intenso e baixa umidade do ar, essa forma de disseminação é improvável.

O real papel dos animais portadores ou *carriers* na epidemiologia da infecção não está totalmente definido. Vários registros de surtos que iniciaram após a introdução de bovinos que haviam se recuperado da infecção apontam para um possível envolvimento desses animais, porém ainda falta a confirmação. Em circunstâncias normais, os animais portadores não excretam o vírus e este não pode ser detectado no meio onde o animal vive. O risco de um animal portador iniciar um surto é muito baixo e deve ser diferenciado da introdução de animais com infecções subclínicas ou com lesões não-detectadas. Nesse último caso, os pequenos ruminantes podem possuir um papel importante, pois as lesões nessas espécies são discretas e de difícil observação.

O animal portador é definido como sendo um animal sem sinais clínicos, em que o vírus infeccioso pode ser recuperado das secreções orofaríngeas após um período de 28 dias pós-infecção. Esses animais podem ter sofrido infecções clínicas ou subclínicas. A imunidade conferida pela vacinação não impede o estabelecimento de uma infecção subclínica e a conseqüente produção do estado de portador. O estabelecimento da infecção persistente depende do sorotipo envolvido, e a duração depende da espécie envolvida e de fatores individuais. Em bovinos, o período de permanência pode variar de meses até um ano e facilmente atingir mais de 50% dos animais. Esse

período poder ser maior nos búfalos africanos (*Syncerus caffer*), chegando até cinco anos, porém a média é de um a três anos. Os búfalos asiáticos domésticos (*Buballus arnee*) permanecem portadores por vários meses. Nos pequenos ruminantes, como ovelhas e cabras, a persistência é menos estudada, porém atinge uma parcela menor da população e por um período não superior a seis meses. Por razões desconhecidas, os suínos não permanecem portadores.

A infecção natural pelo FMDV atinge várias espécies de animais da ordem *Artiodactyla* (biungulados), incluindo vários cervídeos, antílopes, impalas, lhamas, gazelas, suínos selvagens e capivaras. Os sinais clínicos nessas espécies são mais discretos ou moderados, e o estado portador pode se detectar, porém de maneira inconsistente. Nos zoológicos, é comum a presença de animais susceptíveis ao FMDV e, por causa da intensa movimentação de animais entre parques zoológicos, a possibilidade da introdução deve ser considerada. O grande risco dos animais selvagens é a manutenção da infecção e a transmissão do vírus para as criações domésticas de ruminantes e suínos. Essa é uma preocupação constante na África, onde animais da grande população de vida livre freqüentemente entram em contato com criações comerciais. As normas da OIE, que estabelecem o comércio internacional de animais e produtos, não fazem distinção entre animais domésticos e selvagens para considerar a situação epidemiológica do país ou região.

A variabilidade genética do vírus (por volta de oito substituições de nucleotídeos por ciclo de replicação) tem sido utilizada na caracterização de isolados do FMDV, ao se determinar o padrão de distribuição geográfica durante um surto. Uma região de 200 nucleotídeos no gene da VP1 tem sido utilizada para comparações genômicas entre os isolados de FMDV. Diferenças inferiores a 4% entre dois isolados indicam um origem comum recente, enquanto diferenças de 15% ou mais apontam para origens geográficas distintas ou surtos separados por muitos anos. Os isolados com identidade superior a 85% são agrupados como topotipos e tendem ser restritos quanto à distribuição geográfica.

5.1.4 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A maioria das infecções pelo FMDV inicia pela penetração do vírus pelas vias respiratórias superiores, seguida de uma multiplicação inicial na mucosa da orofaringe. A seguir, o vírus pode se disseminar localmente e replicar nas vias aéreas inferiores, inclusive nos pulmões. O vírus também pode penetrar através de soluções de continuidade na pele do focinho, das patas e tetas. Após a replicação inicial, o vírus atinge a corrente sanguínea e distribui-se por todo o organismo do animal. O vírus pode replicar em vários tecidos e, geralmente, as lesões são observadas nesses sítios de replicação, como cavidade oronasal, patas, coração, tetas e glândula mamária. O pico de infectividade ocorre nas horas anteriores ao surgimento das lesões e se reduz consideravelmente nos três a quatro dias subsequentes. As lesões são geralmente severas e resultam em queda na performance do animal, podendo produzir seqüelas que influenciam na produtividade futura. O vírus também é excretado em altos níveis em gotículas e aerossóis pela respiração e pelas fezes, urina, leite e sêmen.

Os bovinos são infectados principalmente por inalação, freqüentemente a partir de suínos, que secretam grande quantidade de vírus por aerossóis respiratórios. Os suínos são infectados principalmente por ingestão de alimentos contaminados. Em suínos, ovinos e caprinos, os sinais clínicos são similares, porém mais suaves. Nessas espécies, a claudicação é o sinal predominante. Em ovinos, a infecção pode se disseminar pelo rebanho com sinais discretos ou mesmo assintomática. A febre aftosa não é considerada um problema de saúde pública, embora alguns casos de infecção humana já tenham sido documentados.

A FMD é uma doença vesicular altamente contagiosa e os sinais clínicos são atribuídos à replicação viral nos epitélios, o que resulta na formação de vesículas. Os sinais clínicos são precedidos de viremia e um período de depressão, apatia, febre, laminite e anorexia. As lesões vesiculares podem ser observadas na cavidade oral, na língua, narinas, espaço interdigital, banda co-

ronária e nas tetas. Acompanhando o desenvolvimento das vesículas, salivagem excessiva e descarga nasal podem ser observadas. As vesículas podem variar de 0,5 a 1 cm de diâmetro e encontram-se preenchidas com um fluido que possui altas concentrações de vírus. As lesões progridem rapidamente, rompendo-se e formando áreas ulceradas e erodidas que rapidamente cicatrizam. Antes da resolução completa das lesões pode ocorrer a infecção secundária, agravando ainda mais o quadro. Como consequência das lesões, ocorre um comprometimento da funcionalidade do órgão, o que explica a anorexia, dificuldade de movimentação e amamentação. Sequelas podem incluir deformidades e inclusive a perda completa do casco.

O período de incubação é de dois a 21 dias (média de 3 a 8), mas o vírus é geralmente eliminado do organismo antes dos sinais clínicos desaparecerem. A morbidade pode atingir os 100%, mas a mortalidade é muito baixa em animais adultos. Em animais jovens, os índices de mortalidade são frequentemente altos, podendo ser atribuído à capacidade do vírus de infectar o músculo cardíaco. A lesão resultante no miocárdio é conhecida como coração tigrado. Além das lesões observadas nos epitélios citados anteriormente, o vírus pode replicar e produzir lesões nos pilares do rúmen. Em bovinos leiteiros, frequentemente ocorre uma queda na produção leiteira por causa das lesões na pele do úbere e a replicação do vírus na glândula mamária. Abortos podem ocorrer devido às consequências sistêmicas da infecção e não como resultado da infecção fetal.

5.1.5 Imunidade

A proteção imunológica conferida pela infecção natural ou pela vacinação é mediada por anticorpos neutralizantes. Existe uma forte correlação entre níveis desses anticorpos e proteção. Não há evidências de que a imunidade celular desempenhe um papel relevante na proteção da infecção com o FMDV. A imunidade é específica para o sorotipo e subtipo com o qual o animal foi infectado ou vacinado, ou seja, a imunidade conferida contra um sorotipo não irá proteger o animal da infecção clínica com outro sorotipo.

A evolução genética do FMDV é bastante rápida devido às altas taxas de mutação. Isto resulta em diversidade antigênica, o que pode ocasionar falhas na proteção pelos anticorpos. Esse fato possui implicação direta na seleção de amostras usadas para produção de antígenos vacinais, em que se deve utilizar variantes virais imunodominantes que são capazes de induzir proteção para um amplo número de variantes do mesmo sorotipo.

Os animais recém-nascidos que possuem imunidade passiva adquirida da mãe estão protegidos da infecção. Essa imunidade é proporcional à condição imunológica da mãe e à quantidade de colostro ingerido pelo recém-nascido. A vida média da imunidade passiva para bovinos e suínos é em torno de 21 dias, podendo ser detectada até os quatro ou cinco meses de idade. Esse tipo de imunidade possui influência direta na resposta do animal à vacinação.

5.1.6 Diagnóstico

A característica da alta infecciosidade do FMDV e as sérias implicações sanitárias da infecção exigem um diagnóstico urgente e preciso. A possibilidade de FMD deve ser considerada sempre que houver doença vesicular em ruminantes ou suínos, devido ao fato de outros vírus produzirem lesões similares. A apresentação clínica pode auxiliar, porém não é suficiente para o diagnóstico definitivo. Podem ocorrer infecções mistas, de variantes com virulência alterada ou, ainda, com manifestações clínicas mascaradas pela imunidade parcial do rebanho. Por essas razões, a suspeita clínico-epidemiológica deve necessariamente ser confirmada por testes laboratoriais.

O diagnóstico da FMD é realizado pela demonstração do vírus ou de antígenos virais em tecidos e fluidos de animais infectados. A investigação sorológica pode ser empregada, porém em razão da dificuldade de diferenciação entre resposta sorológica vacinal daquela induzida pela infecção natural, não é recomendável para regiões endêmicas ou onde a vacinação é praticada. Em casos suspeitos de FMD, a notificação do serviço oficial veterinário é obrigatória e premente. A coleta, transporte e processamento da

amostra devem ser realizados por pessoal técnico capacitado e em laboratórios de segurança credenciados.

Os materiais de eleição para o diagnóstico da enfermidade incluem fragmentos do epitélio e fluido coletado de vesículas não rompidas ou recentemente rompidas. O material deve ser misturado em partes iguais de meio de transporte contendo glicerol e meio fosfatado (0,04 M). No caso de falta de meio de transporte, meio essencial mínimo ou PBS podem ser utilizados. Por causa da fragilidade do vírus a variações de pH, recomenda-se manter um pH entre 7,2 e 7,6 na amostra. Em casos suspeitos de infecção subclínica ou com lesões discretas, pode-se coletar sangue com anticoagulante e/ou soro. Na presença da mortalidade de animais jovens, tecidos, como o músculo cardíaco, tireóide e linfonodos, podem ser coletados. Quando as lesões são discretas ou suspeita-se de infecções subclínicas e convalescentes, pode-se coletar sangue com anticoagulantes e fluido esofágico-faríngeo (OP), com auxílio de coletores do tipo *probang*. O OP deve possuir restos celulares e ser livre de sangue ou líquido ruminal. Após a coleta, o líquido deve ser misturado com meio de transporte (0,08M solução de fosfato, 0,01% albumina sérica bovina, antibióticos, 0,002% vermelho de fenol e com pH 7,2). O material coletado deve ser acondicionado em um recipiente limpo e vedado para evitar o vazamento da amostra ou a penetração de conteúdo que possa alterar o pH, inativando o vírus. O transporte deve ser realizado imediatamente após a coleta e sob refrigeração (4°C). Em situações nas quais o intervalo entre a coleta e a chegada ao laboratório forem superiores a 24 horas, as amostras devem ser congeladas em nitrogênio líquido ou gelo seco.

Os testes de rotina utilizados para o diagnóstico da FMD são: isolamento viral, fixação de complemento e ELISA de captura. Para o isolamento viral, uma fração do tecido deve ser macerada e o sobrenadante inoculado em cultivo celular. Se o material coletado for o líquido vesicular, pode ser inoculado diretamente. Os cultivos primários de tireóide bovina são as células de eleição para o isolamento do FMDV, mas cultivos primários de rim de bovino, suíno e cordeiros também podem

ser utilizados. As linhagens celulares BHK-21 e IBRS-2 também são utilizadas para o isolamento, porém possuem menor sensibilidade. A confirmação da presença viral e identificação do sorotipo presente em amostras que produziram efeito citopático são realizadas por testes de fixação do complemento ou ELISA.

Outra forma de isolamento viral é a inoculação em camundongos lactentes (2-7 dias de idade). Alguns isolados de campo necessitam de mais de uma passagem antes para se tornarem adaptados a camundongos. O indicativo da presença viral é a mortalidade dos animais inoculados após 48 horas; e a identificação do sorotipo é realizada pelos mesmos testes, utilizando-se uma suspensão do músculo esquelético dos animais mortos. Em casos onde não é observado efeito citopático nos cultivos ou mortalidade nos camundongos em 48 horas, a amostra deve ser congelada, descongelada e inoculada novamente antes de ser considerada negativa.

As provas de fixação de complemento e ELISA de captura são utilizadas para a detecção de antígenos virais. O teste de ELISA é o recomendado pela OIE/FAO para a demonstração da presença de antígenos virais e identificação do sorotipo presente na amostra. O teste de ELISA possui maior sensibilidade e especificidade, sendo indicado na ausência do primeiro.

O uso de testes para a detecção de anticorpos contra as proteínas não-estruturais deve ser realizado com cautela e fundamenta-se no fato de que somente animais infectados – e não aqueles vacinados – desenvolvem anticorpos contra essas proteínas. De fato, os animais vacinados com vacinas inativadas desenvolvem anticorpos apenas contra as proteínas estruturais, pois não ocorre replicação viral e as proteínas não-estruturais não são sintetizadas. No entanto, proteínas não-estruturais podem acidentalmente contaminar as vacinas durante a sua produção, resultando na indução de anticorpos nos animais vacinados. Esse problema é mais comum em animais que receberam múltiplas doses de vacinas. Por esta mesma razão, as vacinas devem ser purificadas para a remoção de todos os traços de proteínas não-estruturais.

Os testes para a detecção de anticorpos são a soro-neutralização (SN), ELISA e VIAA (*virus infection-associated antigen*). Os testes de SN e ELISA são utilizados e reconhecidos para certificação para comércio internacional. O teste de SN é específico para o vírus utilizado e requer de dois a três dias para a obtenção do resultado. Além disso, existe a necessidade de um laboratório equipado e seguro, pois este teste requer a manipulação de vírus vivo. O teste de ELISA é específico, sensível e rápido (4-5 horas) e não envolve manipulação de vírus. Testes de ELISA que detectam anticorpos contra as proteínas 3D e 3ABC foram desenvolvidos e apresentam sensibilidade e especificidade aceitáveis. O VIAA detecta anticorpos contra proteína polimerase 3D, envolvida na replicação viral. Dessa forma, o VIAA não é sorotipo específico e pode resultar em falsos-positivos em animais que foram vacinados várias vezes. Por isso, tem sido recomendada a sua substituição pelo ELISA. O EITB (*enzyme-linked immuno-electrotransfer blot*), desenvolvido pelo PANAFTOSA, possui sensibilidade superior ao VIAA e é amplamente utilizado no programa de controle da FMD no Brasil.

A detecção de animais portadores é realizada através do isolamento viral do vírus presente no fluido esôfago-faríngeo. Esse material é submetido ao tratamento com TTE (trifluortricloroetano) para dissociar os vírions dos anticorpos neutralizantes e de outras substâncias inibidoras. A confirmação da presença e do tipo viral é realizada através da inoculação em cultivo celular e ELISA de captura.

Diversos testes de RT-PCR e PCR em tempo real foram desenvolvidos para a realização do diagnóstico rápido da infecção. O PCR em tempo real é de execução rápida, pode ser adaptado para utilização a campo, sendo capaz de detectar e diferenciar os sete sorotipos possíveis. O foco dos esforços no diagnóstico do FMDV envolve o desenvolvimento de testes rápidos e que sejam capazes de diferenciar a infecção ativa da resposta à vacinação e também detectar os animais portadores.

5.1.7 Controle e profilaxia

O estabelecimento de uma estratégia universal e definitiva para o controle da FMD é contro-

verso e complexo. As medidas a serem adotadas por uma região ou país devem ser baseadas na situação epidemiológica de cada caso. Além disso, vários fatores devem ser considerados para a escolha das melhores alternativas, destacando-se o impacto doméstico e externo nas exportações, a perda de produtividade animal, as consequências econômicas para a região, bem-estar animal, entre outras. Durante a ocorrência de um surto, é extremamente prudente avaliar as medidas que estão sendo adotadas, para que o estudo do risco de disseminação do vírus contemple as necessidades dos segmentos envolvidos. As experiências de vários países e regiões indicam essa necessidade.

Em áreas livres naturais ou que erradicaram o agente, devem-se aplicar medidas preventivas para evitar a introdução do vírus. Essas medidas incluem barreiras sanitárias, restrição ao trânsito de animais oriundos de áreas de risco, desinfecção, quarentena e vacinação (quando indicado). Essas medidas devem ser aplicadas contínua e sistematicamente, sobretudo se existirem áreas de risco nas proximidades. A vigilância deve também incluir a conscientização dos produtores, manutenção da estrutura de diagnóstico, vigilância e combate.

Em casos de surtos em áreas livres ou paraendêmicas, a primeira opção para erradicar o surto é a adoção do rifle sanitário, abatendo-se e incinerando os animais infectados, os contatos e susceptíveis. Essa alternativa é a mais econômica e eficaz quando um pequeno número de animais está envolvido e se for realizada de forma rápida. Outra vantagem do uso desse método é a obtenção do certificado de zona livre em um curto período de tempo. No entanto, em regiões onde a densidade populacional é elevada e ocorre um intenso movimento entre pessoas e animais, essa alternativa pode ser problemática, sobretudo se o vírus já tiver sido disseminado. Outro aspecto que deve ser considerado é a infra-estrutura para o sacrifício dos animais e destruição das carcaças, pois durante essas operações grandes quantidades de material infeccioso são geradas e podem servir de fonte para disseminação. Uma desvantagem desse método de combate refere-se à eliminação de um número excessivo de animais, provavelmente muitos sem necessidade, o que repercute negativamente na sociedade.

Existem várias combinações possíveis de medidas de combate a surtos. As vantagens e desvantagens variam de acordo com a apresentação. Não existe um modelo de medidas que devam ser adotadas para todos os casos. A escolha de um modelo deve ser montada de acordo com a realidade da região envolvida. Porém, em todas as situações, a organização e rapidez das ações irão contribuir para a redução da disseminação do vírus.

Logo após a confirmação do diagnóstico, a propriedade (ou a região) deve ser interditada, evitando-se a saída de quaisquer animais ou produtos que possam servir de veículos para a transmissão viral. Os animais afetados e os potencialmente em contato devem ser abatidos, e as carcaças incineradas ou enterradas com cobertura de cal. Outros ruminantes da propriedade também devem ter o mesmo tratamento. Deve-se ressaltar que o FMDV é extremamente infeccioso e as medidas devem ser drásticas e rígidas para evitar a sua disseminação a partir do foco. A estratégia pode exigir a vacinação perifocal, ou seja, das propriedades vizinhas num raio de 3 km. Essa imunização produz um “cinturão de imunidade” ao redor do foco e dificulta a saída do vírus. Após o abate e a destruição das carcaças, procede-se a desinfecção das instalações e equipamentos. A restrição ao movimento de animais pode seguir até que se tenha segurança que não há mais risco de disseminação. Esses procedimentos devem ser seguidos de um vazio sanitário, que pode chegar a três meses. Nesse período, a propriedade deve permanecer completamente vazia de quaisquer animais susceptíveis ao vírus. O vazio sanitário é seguido da introdução de animais sentinela, geralmente bovinos jovens soronegativos. Esses animais são introduzidos para monitorar a presença residual do agente e são monitorados clínica e sorologicamente para a presença do vírus. Nos casos positivos, deve-se novamente realizar a depopulação, desinfecção e vazio sanitário. Quando os sentinelas não apresentam sinais de infecção, doença ou soroconversão após um determinado período (60-90 dias), pode-se proceder a repopulação da propriedade.

A vacinação é uma importante alternativa para o controle da infecção e erradicação da en-

fermidade de áreas endêmicas e paraendêmicas. Essa alternativa pode ser usada em regiões endêmicas, para reduzir gradativamente a circulação do vírus e a incidência da enfermidade, ou em ocasiões de surtos, para impedir a propagação do vírus. A eficácia da vacinação em regiões endêmicas está diretamente relacionada com a cobertura vacinal. Resultados promissores são obtidos com cobertura vacinal acima de 80% da população bovina. No entanto, esses níveis de cobertura são insuficientes para o objetivo de erradicação. O objetivo da vacinação durante um surto é impedir a disseminação do vírus para outras propriedades. A imunidade conferida pela vacinação consegue reduzir significativamente a quantidade de vírus excretada por um animal após quatro a cinco dias da aplicação. A ocorrência de novos surtos irá diminuir gradativamente após a aplicação da vacina, podendo resultar em prevenção de novos focos em 15 a 20 dias.

As medidas de controle e erradicação devem ser constantemente revistas e atualizadas, de acordo com o surgimento de novas situações. O monitoramento constante da situação epidemiológica mundial deve ser uma rotina e servir de alerta. A manutenção de uma rede eficiente de vigilância, diagnóstico, controle e divulgação das ações deve ser prioridade em qualquer situação.

5.1.8 Vacinas

As vacinas contra a FMD são produzidas a partir de preparações de vírus cultivados em cultivos celulares e inativados quimicamente. Essas preparações são combinadas com adjuvantes para potencializar a resposta imune. O processo de produção é altamente tecnificado e desenvolvido em laboratórios de segurança para evitar escape de vírus. Diferentes testes para assegurar a qualidade e determinar a massa antigênica, potência e inocuidade são realizados antes da liberação de um lote de vacinas. Vacinas formuladas com adjuvantes à base de hidróxido de alumínio, com ou sem saponina, são indicados somente para ruminantes. As vacinas com adjuvante oleoso (dupla emulsão) podem ser utilizadas para suínos e ruminantes. A capacidade imunogênica entre os sorotipos é variável, ou seja, para o soro-

tipo O, é necessária uma massa antigênica maior do que para os sorotipos A, C e Ásia 1. As razões para essa diferença não são conhecidas. Em termos gerais, a massa antigênica varia entre 1-10µg de partículas 146S para cada amostra presente na vacina.

Os componentes das vacinas devem refletir a situação epidemiológica de cada região e podem variar de constituição conforme o caso e a espécie envolvida. As vacinas podem ser monovalentes, isto é, formuladas com somente um sorotipo; ou multivalentes, sendo formuladas com mais de um sorotipo (p. ex.: A, O e Ásia 1). Podem também ser formuladas com várias amostras de um mesmo sorotipo (p. ex.: A). A maioria das vacinas comercializadas no Brasil e na América do Sul são trivalentes, contendo amostras virais dos sorotipos A24 Cruzeiro, O1 Campos e C3 Indaial. Essas cepas são representativas dos vírus circulantes na região e imunodominantes, ou seja, são capazes de conferir proteção contra possíveis variantes. Existe uma constante necessidade de vigilância sorológica dos isolados em surtos para certificar-se que as vacinas disponíveis são próprias para os respectivos locais e para identificar o eventual aparecimento de novas variantes. Os sorotipos A e O são os que apresentam um maior número de variantes.

A eficácia da vacinação é dependente de vários aspectos, dentre eles do armazenamento em temperatura adequada. Vacinas conservadas entre 3-8°C são estáveis por até dois anos. A aplicação deve ser realizada com os animais contidos, especialmente fêmeas gestantes. Vacinas com adjuvante aquoso devem ser aplicadas pela via subcutânea, preferencialmente na região do pescoço ou porção cranial da escápula. O volume recomendado varia entre 2-3 ml para bovinos e 1-2 ml para pequenos ruminantes. Os animais jovens devem receber a mesma dose dos adultos. As vacinas oleosas são administradas em bovinos e suínos pela via intramuscular. Em bovinos, recomenda-se a região superior do pescoço, e, em suínos, a região posterior da orelha. Os constituintes das vacinas são purificados, as reações no sítio de vacinação são discretas, e as reações anafiláticas são incomuns. Reações podem ocorrer devido a problemas na aplicação e, geralmente, estão relacionadas com problemas de contaminação da

seringa ou no momento da vacinação. Reações inflamatórias granulomatosas que persistem por algumas semanas têm sido freqüentemente relatadas após o uso de vacinas com adjuvante oleoso.

A imunidade induzida pela vacinação é capaz de proteger os animais da doença clínica e o pico de produção de anticorpos é atingido após quatro ou cinco semanas da aplicação. A segunda dose deve ser aplicada 30 dias após a primeira vacinação. Vacinações anuais são recomendadas para manter os níveis de imunidade do rebanho. A resposta imune produzida pela vacinação não é esterilizante, ou seja, os animais vacinados e desafiados com o vírus são infectados. No caso dos ruminantes, esses animais podem tornar-se portadores. No entanto, nunca houve comprovação da transmissão do vírus entre animais portadores e susceptíveis. Animais jovens respondem satisfatoriamente à vacinação, porém, em razão da imunidade materna interferir na resposta à vacinação, recomenda-se vacinar somente animais com idade superior a dois meses.

5.1.9 Perspectivas

A febre aftosa é responsável pelas maiores restrições ao comércio internacional de animais e seus subprodutos. Quando um surto ocorre em um determinado país, seus parceiros comerciais interrompem a importação de animais, produtos animais e freqüentemente de outros produtos agrícolas. Tais circunstâncias resultam em perdas permanentes de mercado para os países afetados. Muito tem sido realizado para melhorar as vacinas e métodos de diagnósticos, assim como para o desenvolvimento de terapias para conter a propagação viral. No entanto, nenhuma alternativa ainda está disponível comercialmente, abrindo uma área interessante para pesquisa e desenvolvimento. A febre aftosa é clinicamente semelhante – e assim pode ser confundida – com a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), língua azul, mamelite herpética e peste bovina. Também é semelhante à estomatite vesicular, doença vesicular suína e exantema vesicular dos suínos. Por isso, testes rápidos e capazes de diferenciar entre essas enfermidades são necessários.

Alguns conceitos em relação ao FMDV e as medidas de controle são baseados em suposições ou em situações de épocas anteriores. O papel dos animais portadores na epidemiologia da enfermidade nunca foi totalmente comprovado. Mesmo assim, formas de diferenciação entre animais vacinados e portadores deve ser um dos focos de estudos futuros. O conceito de que as vacinas não possuem eficácia deve ser combatido. As medidas de erradicação e eliminação dos animais infectados e contatos devem ser adotadas de acordo com a realidade da região e as consequências resultantes. Pelo menos, é muito discutível descartar um grande número de animais e desestabilizar uma região ou país inteiro somente para a manutenção da condição sanitária e comercial. As diferentes formas como os surtos de 2001, no Reino Unido e Uruguai, foram combatidos serviram como um bom exemplo do potencial social e psicológico do impacto que se segue a uma epidemia de FMD. O intenso comércio de animais e seus subprodutos no mundo, muitas vezes ilegal, a mobilidade cada vez maior das pessoas, redução na vacinação de rebanhos, a constante expansão de amostras do FMDV e a maior interação das pessoas com a vida silvestre devem ser considerados para a formulação de programas de prevenção. No momento do surgimento de um foco da enfermidade, vários aspectos devem ser considerados, e as ações devem ser tomadas o mais breve possível. Com a evolução do surto, as medidas devem ser avaliadas constantemente, levando em consideração todos os segmentos da sociedade envolvida ou possivelmente afetada e, se necessário, novas medidas devem ser consideradas e implementadas.

Na década passada, a América do Sul atingiu uma situação privilegiada em relação ao controle. Porém, devido a diversos fatores, a erradicação não foi possível, e a região deparou-se com a reemergência da FMD. Para avançar no controle e obter a erradicação da enfermidade da região, existe a necessidade de conscientização de todos os países, principalmente dos países em que a produção bovina não é desenvolvida, para esforços direcionados ao combate aos focos. O papel dos países produtores será de extrema importância, pois esses devem liderar, e até mesmo financiar, os programas de combate à doença na

região, pois certamente serão os mais favorecidos com a abertura do comércio internacional.

5.2 Vírus da doença vesicular dos suínos

A doença vesicular dos suínos (SVD) é uma enfermidade moderadamente contagiosa e aguda, caracterizada por febre e produção de vesículas no focinho, boca, pés e tetas. A doença pode ser introduzida em uma granja por animais infectados, restos de alimentos ou dejetos contaminados. Os suínos são os únicos hospedeiros naturais, e a doença pode variar em gravidade, mas raramente é fatal. Altos títulos virais estão presentes no animal, nos seus fluidos corporais e excreções. Os sinais clínicos da SVD incluem ainda febre, perda de apetite, dificuldade de locomoção (por causa das vesículas nas patas). O desenvolvimento das vesículas ocorre entre 2 e 11 dias após a infecção. O pico da viremia ocorre 2 a 4 dias após a infecção e persiste por, aproximadamente, sete dias. A recuperação ocorre normalmente em 1 a 3 semanas, mas partículas virais infecciosas podem ser encontradas nas fezes por até três meses em animais portadores. O SVDV pode permanecer viável por mais de 30 dias sob refrigeração, com o pH entre 3,9-9,1.

As lesões vesiculares em suínos são clinicamente indistinguíveis das causadas pelo FMDV, pelo vírus da estomatite vesicular e vírus do exantema vesicular; e suas características histopatológicas também são muito similares. As lesões vesiculares se desenvolvem na língua, lábios e focinho, bandas coronárias e região posterior das patas, e iniciam como uma região hiperêmica e que aumenta com o progresso da formação das vesículas. O epitélio da região plantar pode tornar-se frouxo, podendo ocorrer a perda do casco. As lesões na boca, nos lábios e focinho são menos frequentes. As lesões frequentemente sofrem infecções bacterianas secundárias.

O primeiro relato de SVD foi descrito na Itália, em 1966, e o agente etiológico foi identificado em 1968. Desde então, a doença tem sido esporadicamente descrita na Europa, Japão, Hong Kong e Taiwan. Não há relatos da presença da SVD nas Américas. O vírus pertence ao gênero *Enterovirus* e é altamente relacionado com o vírus Coxsackie B5 de humanos (CV-B5). Baseados na

similaridade de nucleotídeos, tem sido proposto que o SVDV foi introduzido na população suína pela transmissão do CV-B5 a partir de humanos. Os vírions são muito estáveis sob pH ácido, no ambiente e resistem aos desinfetantes comuns. A viabilidade pode ser mantida após dessecação, congelamento, fermentação e processo de defumação usado para preservar produtos suínos, podendo persistir no material contaminado por longo período de tempo.

Somente um sorotipo do SVDV foi descrito até o presente, e o vírus não apresenta reatividade sorológica cruzada com outros picornavírus, incluindo os enterovírus suínos. O diagnóstico da SVD baseia-se em testes laboratoriais, que são absolutamente necessários para diferenciá-la da FMD. As amostras a serem enviadas ao laboratório incluem sangue com anticoagulante para isolamento viral, soro, tecidos de lesões e líquidos vesiculares. O diagnóstico é realizado através do isolamento viral em células de cultivo, por fixação do complemento e ELISA de captura para a detecção de antígenos; ou através de SN, para a detecção de anticorpos. Os resultados dos testes de ELISA e SN são disponíveis em um a três dias. A caracterização da amostra, para usos epidemiológicos, pode ser realizada por seqüenciamento de determinadas seqüências da VP1. A microscopia eletrônica também pode ser utilizada para a visualização de partículas víricas no material clínico.

A prevenção deve ser direcionada, a fim de evitar a introdução do vírus em áreas e rebanhos livres, pelo estrito controle de animais importados de áreas infectadas e pela regulamentação do movimento de animais ou produtos de origem animal. O controle deve também incluir inspeção veterinária, testes sorológicos e certificação de propriedades. O controle também deve contar com sistemas de detecção e diagnóstico rápidos, vigilância sorológica e sistema de informação sobre a doença. Atualmente, não existem vacinas disponíveis contra o SVDV.

5.3 Enterovírus suíno tipo 1

O enterovírus suíno-1 é o agente etiológico da polioencefalomielite suína ou doença de Teschen. O período de incubação da enfermidade

varia entre 4 e 28 dias, e os sinais clínicos caracterizam-se por febre, anorexia, depressão, evolução para sinais neurológicos como tremores e incapacitação, convulsões, coma e morte. A patogenicidade é influenciada pela amostra viral, idade e condição imunológica dos animais. Em casos severos, a mortalidade pode atingir até 75%, principalmente em animais jovens. A transmissão ocorre por contato com animais infectados ou por objetos contaminados com o vírus. Após a penetração, o vírus replica no trato alimentar e linfonodos associados, disseminando-se por viremia, onde atinge e infecta o sistema nervoso central. As lesões neurológicas incluem gliose, manguitos perivascular e degeneração neuronal. O diagnóstico é realizado através do isolamento viral em cultivo celular (primário ou linhagem) de origem suína e demonstração do agente por imunofluorescência. O diagnóstico diferencial deve ser feito de outras enfermidades que infectam o sistema nervoso central, como peste suína africana, peste suína clássica, raiva entre outras. O controle pode ser realizado pelo uso de vacina inativadas ou atenuadas, além de medidas de isolamento, quarentena e desinfecção.

5.4 Enterovírus suínos tipos 2-11

Os enterovírus suínos constituem um grupo de vírus (2-11) presentes em virtualmente todas as criações suínas. A sua identificação foi realizada na década de 1960, na Europa Oriental. A grande maioria das infecções possui apresentação subclínica. Os enterovírus suínos são classificados no gênero *Enterovirus* da família *Picornaviridae*, e as propriedades estruturais são semelhantes às descritas para o restante da família. A alta resistência a variações de pH (2-9) – e também a temperaturas abaixo de 15°C – favorece a sua permanência por longo tempo no meio ambiente. A transmissão ocorre por contato direto ou indireto, entre animais ou de animais com dejetos contaminados. Embora se acredite que a maioria das infecções seja subclínica, em determinadas circunstâncias são observadas infecções clínicas. Nesses casos, observam-se: doença entérica, respiratória, abortos e outras falhas reprodutivas, além de doença neurológica. Os enterovírus são facilmente isolados e cultivados em células de cultivo primárias

ou de linhagem de origem suína, como as IBRS-2 e PK-15. O diagnóstico somente deve ser buscado quando existe a suspeita clínica. A confirmação da presença do agente é realizada pelo isolamento em cultivo, seguido da detecção de antígenos por imunofluorescência ou imunoperoxidase. A sorologia e fixação do complemento são métodos auxiliares na classificação em sorotipos e também para demonstrar a ocorrência da infecção. Medidas de prevenção e controle devem ser tomadas somente nos casos confirmados do envolvimento do enterovírus na etiologia da enfermidade.

5.5 Enterovírus bovino

Um grande número de enterovírus tem sido isolado do trato digestivo, respiratório e reprodutivo de bovinos. Alguns isolados são associados com manifestações clínicas, como diarreia, doença respiratória e abortos. No entanto, tentativas de reproduzir essas manifestações pela inoculação experimental de animais têm, geralmente, resultado infrutíferas. Isso dificulta o estabelecimento da patogenia e da real importância desses vírus. Sabe-se, porém, que são vírus amplamente difundidos na população bovina, pois um percentual altíssimo de animais e rebanhos possui sorologia positiva. Em alguns casos de doença respiratória, as lesões presentes podem ser confundidas com a FMD. As propriedades biológicas dos enterovírus bovinos são as mesmas descritas para outros membros no mesmo gênero. Em razão da facilidade de replicação desses vírus em células de cultivo, a grande maioria dos isolados são achados acidentais ou isolados de infecções subclínicas. A confirmação da identidade do agente pode ser realizada por ME ou por técnicas de detecção de antígenos. Neutralização com anti-soro específico também é um método de identificação desse vírus, após o seu isolamento em cultivo celular.

5.6 Rinovírus equino e bovino

Os rinovírus constituem um grupo de vírus que infectam várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, eqüinos e bovinos. Em bovinos e eqüinos, os rinovírus são considerados como pa-

tógenos menores, sem muita importância clínica. Existem dois rinovírus eqüinos (EqRV), 1 e 2, que foram inicialmente classificados de acordo com a sua estabilidade ao pH. O rinovírus eqüino 1 é sensível ao pH ácido, característica semelhante ao FMDV, o que fez com que fosse classificado no gênero *Aphthovirus*. Curiosamente, os sinais clínicos em eqüinos lembram os sinais observados em bovinos com FMD. Além disso, alguns animais podem apresentar comprometimento sistêmico. O rinovírus eqüino tipo 2 é resistente ao pH ácido, característica semelhante aos enterovírus. No entanto, o seqüenciamento do genoma revelou semelhança com os cardiovírus. Até o presente, o rinovírus eqüino 2 não foi associado com manifestações clínicas.

A infecção pelo rinovírus bovino (BoRV) geralmente cursa de forma subclínica ou sinais respiratórios leves. Esses vírus estão classificados no gênero *Rhinovirus* e apresentam características estruturais e biológicas semelhantes aos outros membros do gênero, incluindo a labilidade ao pH baixo. Em infecções clínicas, os sinais clínicos apresentados são: febre, depressão, anorexia, lacrimejamento, conjuntivite, descarga nasal e dificuldade respiratória, nos casos graves. Pelo fato de os sinais clínicos serem discretos ou inespecíficos, o diagnóstico deve ser realizado pelo isolamento do vírus em cultivo celular e detecção dos antígenos por imunofluorescência.

5.7 Vírus da encefalomiocardite

O vírus da encefalomiocardite (EMCV) foi identificado, em 1960, no Panamá e, desde então, tem sido descrito em vários locais, como os Estados Unidos, Europa, África e alguns países da América Central. A sua presença foi descrita no Brasil em 1985. O EMCV pertence ao gênero *Cardiovirus*, é resistente a solventes orgânicos e às variações de pH, e possui atividade hemaglutinante em eritrócitos de ratos, ovinos, cobaias e eqüinos. O EMCV é considerado um vírus originalmente de roedores, porém é capaz de infectar uma variedade de outros mamíferos, como chimpanzés, macacos, elefantes, leões, esquilos, suínos, entre outros. Os roedores são considerados os principais reservatórios do vírus, dos quais o

vírus pode ser isolado, com frequência, de fezes e urina. Assim, os principais veículos de transmissão para suínos são o alimento e água contaminados com fezes ou urina de roedores. Em suínos jovens, os sinais clínicos caracterizam-se por anorexia, paralisia, dispnéia e morte súbita devido à miocardite. Em animais recém-desmamados, a mortalidade pode se aproximar de 100%. Em animais jovens e adultos, as infecções são geralmente subclínicas. Fêmeas prenhes podem apresentar problemas reprodutivos como aborto, reabsorção, natimortalidade, mumificação fetal e nascimento de animais prematuros. As lesões macro e microscópicas são auxiliares no diagnóstico. O diagnóstico do EMCV de animais que morreram de miocardite ou em fêmeas com problemas reprodutivos é realizado pelo isolamento viral em cultivo celulares ou em ovos embrionados. A confirmação do agente é realizada pela detecção de antígenos virais nas células de cultivo por imunofluorescência. A presença de roedores mortos na propriedade, sem causa aparente, seguida do isolamento viral a partir desses animais pode confirmar o diagnóstico. As medidas de prevenção e controle da enfermidade devem ser direcionadas para o combate de roedores.

5.8 Vírus da encefalomielite das aves

O vírus da encefalomielite das aves (AEV) produz a enfermidade conhecida como encefalomielite das aves (AE), que acomete principalmente pintinhos com 1 a 4 semanas de idade. Já em aves com idade superior a 28 dias, as infecções são geralmente subclínicas. Perus, faisões e codornas são também susceptíveis à infecção, que geralmente é subclínica ou com manifestações clínicas leves. Existe somente um sorotipo do vírus, porém é observada uma variação de virulência entre os isolados de campo. A principal forma de transmissão é transovariana, e as manifestações clínicas são observadas em pintos com até quatro semanas de vida. A apresentação clínica da AE caracteriza-se por ataxia, incordenação, tremores da cabeça e pescoço e morte. Em aves adultas, os sinais são discretos, porém observa-se queda na postura que pode chegar a 15%. Uma alta morbidade e mortalidade são observadas

logo após a introdução do vírus no aviário, e esses índices se reduzem com o estabelecimento da infecção na criação. O diagnóstico é realizado através do isolamento viral a partir de macerados do cérebro de pintos doentes. O isolamento pode ser feito pela inoculação via intracerebral em pintos de um dia, o que reproduz a enfermidade neurológica em até 28 dias. Outra forma de isolamento viral é a inoculação no saco da gema de ovos embrionados de 5-7 dias de incubação. Após 12 dias, os embriões são necropsiados e a presença de atrofia muscular da perna e morte embrionária é indicativa da presença do agente. Pelo fato do AEV não produzir efeito citopático em células de cultivo, a técnica de isolamento não é recomendada para o diagnóstico. A detecção de anticorpos através de SN ou ELISA podem auxiliar no diagnóstico. O controle da enfermidade é realizado pela depopulação da granja ou pelo uso de vacinas atenuadas ou inativadas.

6 Bibliografia consultada

- AGOL, V.I.; PAUL, A.V.; WIMMER, E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. **Virus Research**, v.62, p.129-147, 1999.
- BARNETT, P.V. et al. Evidence that high potency foot-and-mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the "carrier" state in sheep. **Vaccine**, v.22, p.1221-1232, 2004.
- BAXT, B.; RIEDER, E. Molecular aspects of foot-and-mouth disease virus virulence and host range: role of host cell receptors and viral factors interactions. In: SOBRINHO, F.; DOMINGO, E. (eds). **Foot-and-mouth disease: current perspectives**. Norfolk, UK: Horizon Press, 2004. Cap.7, p.145-172.
- BERGMANN, I.E. et al. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bio-engineered nonstructural viral antigens. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.825-831, 1993.
- CORREA MELO, E.; LOPEZ, A. Control of foot and mouth disease: the experience of the Americas. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.21, p.695-698, 2002.
- DAWE, P.S. et al. Natural transmission of foot-and-mouth disease virus from African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in a wildlife area of Zimbabwe. **The Veterinary Record**, v.134, p.230-232, 1994.

- DOEL, T.R. FMD vaccines. **Virus Research**, v.91, p.81-100, 2003.
- FENNER, F.J. et al. Caliciviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 2.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1993. Cap.23, p.425-430.
- FENNER, F.J. et al. Picornaviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 2.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1993. Cap.22, p.403-423.
- GRUBMAN, M.J. et al. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. **Journal of Virology**, v.50, p.579-586, 1984.
- HOUSE, J.A.; HOUSE, C.A. Vesicular diseases. In: STRAW, B.E. et al. (eds). **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999. Cap.25, p.327-340.
- KITCHING, R.P.; SALT, J.S. The interference by maternally-derived antibody with active-immunization of farm animals against to food-and-mouth disease. **The British Veterinary Journal**, v.151, p.379-389, 1995.
- LYRA, T.M.P.; SILVA, J.A. A febre aftosa no Brasil, 1960-2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.565-576, 2004.
- OIE. Foot and mouth disease. In: _____. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. 3.ed. Paris, France: OIE, 1996. Cap.2.1.1, p.47-56.
- RIEDER, E.; WIMMER, E. Cellular receptors of Picornaviruses: an overview. In: SEMLER, B.L.; WIMMER, E. (eds). **Molecular Biology of Picornaviruses**. Washington, DC: ASM Press, 2002. p.61-70.
- RUECKERT, R.R. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.21, p.609-654.
- RUECKERT, R.R.; WIMMER, E. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. **Journal of Virology**, v.50, p.957-959, 1984.
- SUTMOLLER, P. et al. Control and eradication of foot-and-mouth disease. **Virus Research**, v.91, p.101-104, 2003.
- VAN DER HEIDE, L. Encephalomyelitis. In: SWAYNE, D.E. et al. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4.ed. Tallahassee, FL: American Association of Avian Pathologists, 1998. Cap.35, p.197-199.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. **Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, CA: Academic Press, 2000. 1162p.

1 Introdução	565
2 Características comuns aos membros da família <i>Flaviviridae</i>	565
2.1 O vírion e o genoma	565
2.2 O ciclo replicativo	566
3 Características que diferenciam os membros da família <i>Flaviviridae</i>	567
4 Classificação	568
4.1 Gênero <i>Flavivirus</i>	568
4.1.1 Vírus da Louping ill	570
4.1.2 Vírus Wesselbron	571
4.1.3 Vírus da encefalite japonesa	571
4.1.4 Vírus do Nilo Ocidental	572
4.2 Gênero <i>Pestivirus</i>	576
4.2.1 Vírus da peste suína clássica	579
4.2.2 Vírus da diarreia viral bovina	582
4.2.3 Vírus da doença da fronteira	589
4.3 Gênero <i>Hepacivirus</i>	589
5 Bibliografia consultada	590

1 Introdução

A família *Flaviviridae* abriga vários vírus de importância em saúde humana e animal. Os membros dessa família possuem vírions pequenos, envelopados, que contêm uma molécula de RNA linear de polaridade positiva como genoma. A família é dividida em três gêneros: *Flavivirus* (do latim *flavus* – amarelo), *Pestivirus* (do latim *pestis* – peste) e *Hepacivirus* (do grego *heptos* – fígado). A família *Flaviviridae* foi estabelecida há poucos anos e abriga vários vírus anteriormente classificados na família *Togaviridae* (flavivírus e pestivírus), além dos hepacivírus, que foram identificados posteriormente.

Os flavivírus (denominação dos membros do gênero *Flavivirus*) são transmitidos primariamente por insetos. O protótipo desse gênero (e da família) é o vírus da febre amarela (YFV), responsável por doença severa em humanos em regiões tropicais/equatoriais. O YFV é mantido na natureza por meio de infecções alternadas em mamíferos silvestres e insetos e, ocasionalmente, é transmitido a humanos. Os vírus do Nilo Ocidental (WNV) e das encefalites japonesa (JEV) e Saint Louis (SLEV) são também vírus zoonóticos de importância em sanidade animal. O vírus da dengue possui grande importância como patógeno humano. O gênero *Pestivirus* inclui o vírus da peste suína clássica (CSFV), o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o vírus da doença da fronteira

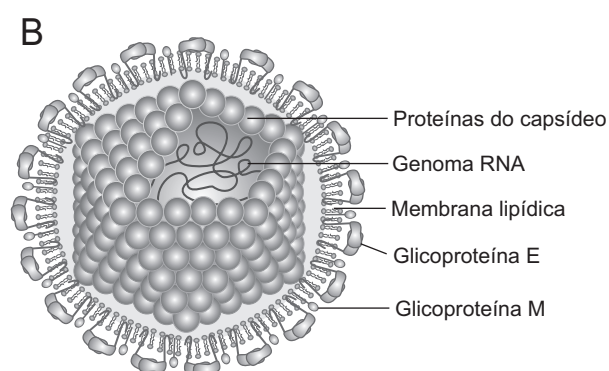
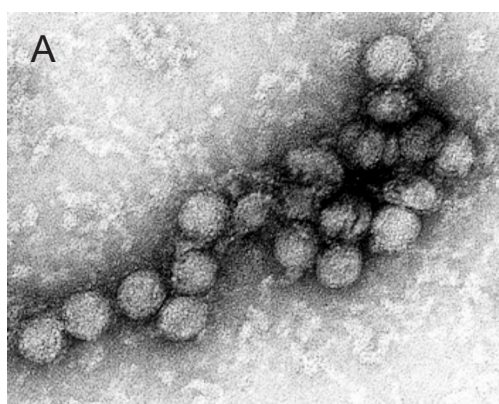
(BDV), que infectam exclusivamente animais. O vírus da hepatite C (HCV) é um patógeno exclusivamente de humanos, não é transmitido por insetos e se constitui no único membro do gênero *Hepacivirus*.

2 Características comuns aos membros da família *Flaviviridae*

Os membros da família *Flaviviridae* apresentam várias características em comum, que serviram de base para a sua classificação nessa família. Essas características incluem a estrutura e morfologia dos vírions, o tipo, estrutura e organização do genoma e os aspectos básicos da expressão gênica e replicação viral. Essas propriedades comuns, quando analisadas em conjunto, indicam que esses vírus provavelmente derivam de um ancestral comum.

2.1 O vírion e o genoma

Todos os membros da família possuem vírions esféricos (40-60 nm de diâmetro) que contêm um nucleocapsídeo icosaédrico revestido externamente por um envelope derivado das membranas da célula hospedeira (Figura 22.1). Em algumas espécies, os vírions possuem um formato esférico, tendendo a hexagonal, pois o envelope está intimamente associado ao nucleocapsídeo. A presença do envelope torna esses



Fonte: A) PHIL Library, CDC.

Figura 22.1. Morfologia e estrutura das partículas víricas da família *Flaviviridae*. A) Foto de microscopia eletrônica de vírions do vírus do Nilo Ocidental (WNV); B) Ilustração esquemática de uma partícula vírica com os seus componentes.

vírus susceptíveis à inativação por solventes orgânicos e detergentes. O envelope contém duas (flavivírus e hepacivírus) ou três (pestivírus) glicoproteínas virais inseridas.

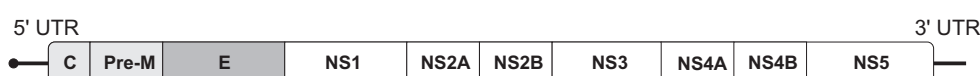
O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com 9 a 12,3 kb. Esta molécula de RNA apresenta duas regiões não-traduzidas (UTRs) próximas às extremidades 5' e 3' e possui uma única fase aberta de leitura (ORF) (Figura 22.2). Durante o ciclo replicativo, não ocorre a produção de RNA mensageiros subgenômicos. As proteínas estruturais são codificadas no terço próximo à extremidade 5'; enquanto os genes das proteínas não-estruturais localizam-se nos dois terços próximos à extremidade 3'. A ORF é traduzida em uma longa poliproteína, que é clivada em proteínas individuais à medida que é produzida. A estrutura e organização genômica comparada dos vírus pertencentes aos três gêneros da família estão apresentados na Figura 22.2.

2.2 O ciclo replicativo

O esquema geral de replicação dos vírus da família *Flaviviridae* está representado na Figura 22.3. A replicação do genoma e a produção da progênie viral ocorrem inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. A penetração dos vírions nas células ocorre por endocitose, após a interação entre proteína(s) do envelope viral e receptores da membrana plasmática. Após a acidificação dos endossomos, ocorre a fusão do envelope com a membrana endossomal, o capsídeo dissocia-se, e o genoma é liberado no citoplasma. O RNA genômico de polaridade positiva é traduzido em toda a sua extensão, originando uma poliproteína que é clivada em proteínas individuais à medida que é sintetizada. A clivagem da poliproteína por proteases celulares e virais origina as proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas não-estruturais auxiliam no processo

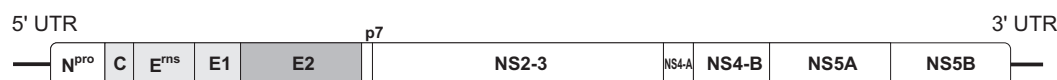
Gênero *Flavivirus*

11 Kb, 5' UTR cap



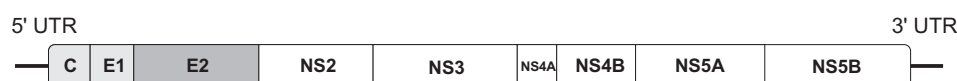
Gênero *Pestivirus*

12,3 Kb, 5' UTR IRES



Gênero *Hepacivirus*

9,4 Kb, 5' UTR IRES



- Proteínas não-estruturais
- Proteínas estruturais
- Proteína estrutural imunodominante

Figura 22.2. Estrutura e organização genômica comparada de vírus dos três gêneros da família *Flaviviridae*.

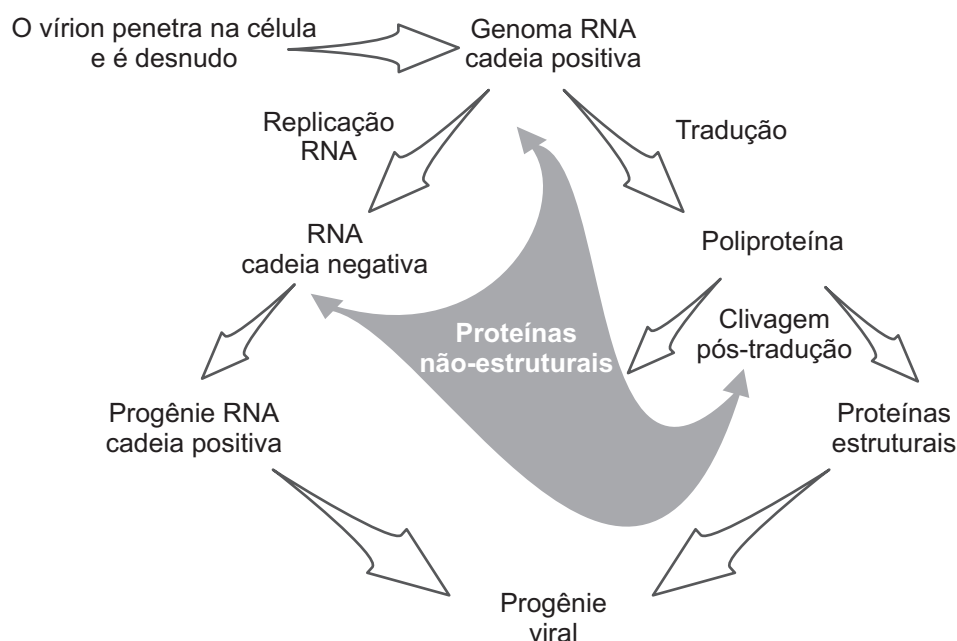


Figura 22.3. Representação esquemática do ciclo replicativo dos vírus da família *Flaviviridae*.

de clivagem desta poliproteína e atuam na replicação do genoma. A replicação do genoma envolve a síntese de uma molécula de RNA de sentido antígeno (polaridade negativa). Esse RNA serve de molde para a síntese dos RNAs de polaridade positiva que servirão para mais etapas de tradução e, posteriormente, serão encapsulados como genoma da progenie viral. As proteínas estruturais são utilizadas na montagem e construção da progenie viral. A morfogênese das novas partículas virais ocorre na região perinuclear do citoplasma, em associação com as membranas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático liso. As partículas recém-formadas aparecem em vacúolos no citoplasma e a sua liberação ocorre pela fusão dessas vesículas com a membrana plasmática. A ruptura da célula não parece ser um pré-requisito para a liberação dos vírions. As consequências da replicação viral para a fisiologia e integridade das células variam de acordo com o vírus e com a célula hospedeira, e vão desde infecções absolutamente inaparentes (flavivírus em células de mosquitos; BVDV não-citopático em células de mamíferos) até lise e destruição celular (flavivírus em células de vertebrados; BVDV citopático em linhagens celulares de bovinos).

3 Características que diferenciam os membros da família *Flaviviridae*

Os gêneros da *Flaviviridae* diferem entre si na extensão do genoma, em alguns detalhes da estrutura e organização genômica, no número e função de produtos gênicos e em alguns aspectos biológicos. Várias dessas características são utilizadas para a sua classificação em gêneros e espécies. As principais diferenças entre os gêneros estão apresentadas na Tabela 22.1. Os pestivírus codificam duas proteínas que não são encontradas nos outros gêneros: a proteína não-estrutural N^{pro} , que é codificada pelo primeiro gene da ORF, e a glicoproteína E^{ms} . A N^{pro} é uma proteinase cuja única função conhecida é se autoclavar da poliproteína logo após a sua síntese; a E^{ms} (ou E_0) é uma glicoproteína associada ao envelope viral e pode também ser secretada das células infectadas. Além disso, a E^{ms} possui atividade ribonuclease. Enquanto a maioria dos flavivírus e hepacivírus são inativados sob pH baixo, os pestivírus podem ser diferenciados por resistirem à inativação por pH baixo e por apresentarem certa estabilidade em uma ampla faixa de pH.

Tabela 22.1. Características gerais dos três gêneros da família *Flaviviridae*.

Gênero	Genoma		Multiplicação eficiente em cultivo	Hospedeiros			Vetores artrópodes
	Extensão	5'		Humanos	Animais domésticos	Animais silvestres	
<i>Flavivirus</i>	11kb	5' cap	X	X	X	X	X
<i>Pestivirus</i>	12.5kb	IRES	X	-	X	X	-
<i>Hepacivirus</i>	9,6kb	IRES	-	X	-	-	-

4 Classificação

De acordo com propriedades biológicas, ecológicas e moleculares, os membros da *Flaviviridae* são divididos em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. A seguir, são descritas as principais características dos vírus de cada gênero.

4.1 Gênero *Flavivirus*

São utilizados sete critérios para a classificação das espécies neste gênero, que serão descritas a seguir.

– Homologia de seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos

As diferentes espécies de vírus classificados no gênero *Flavivirus* são mais divergentes entre si quando comparadas com a divergência existente entre os membros dos gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus*. No entanto, as estruturas secundárias nas regiões UTRs 5' e 3' do RNA genômico são conservadas entre as espécies desse gênero. De acordo com essas características, os vírus do gênero *Flavivirus* podem ser divididos em três grupos genômicos. Alguns desses vírus não apresentam vetores artrópodes conhecidos:

- Flavivírus transmitidos por carrapatos: vírus Gadget Gully, Kyasanur Forest, Langat, Louping Ill, febre hemorrágica Omsk, Powassan, Royal Farm, *Tick-borne encephalitis* (TBEV), Sea-bird tick-borne, Kadam, Meaban, Saumarez Reef e vírus Tyuleni;

- Flavivírus transmitidos por mosquitos: vírus Aroa, dengue, Kedougou, Cacipacore, encefalite japonesa (JEV), Koutango, encefalite Murray Valley (MVEV), Nilo Ocidental (WNV), Yaounde, Kokobera, Ntaya, Bagaza, Ilhéus, Israel turkey, Tembuso, Zika, Banzi, Bouboui, Edhe Hill, Jugra, Saboya, Sepid, Uganda, Wesselbron e vírus da febre amarela (YFV);

- Flavivírus sem vetor artrópode conhecido: vírus Entebbe dos morcegos, Yokose, Modoc, Apoi, Cowbone Ridga, Sal Vieja, San Perlita, Rio Bravo, Bukalasa dos morcegos, Carey Island, Dakar Bat, Montana Myotis, Phnom Pehn Bat.

– Características antigênicas

Todos os vírus do gênero *Flavivirus* são antígenicamente relacionados entre si. No entanto, testes de neutralização viral têm sido utilizados para identificar sorogrupos entre os vírus altamente relacionados. Com base na similaridade antigênica detectada nesses testes, a maioria dos vírus do gênero tem sido classificada em um dos oito sorogrupos: dois sem vetor conhecido (Modoc e Rio Bravo); dois transmitidos por carrapatos (TBEV e Tyuleni) e quatro transmitidos por mosquitos (Uganda S, dengue, Ntaya e JEV). No entanto, alguns vírus, incluindo o protótipo da família, o YFV, não se enquadram em nenhum desses sorogrupos.

– Origem geográfica

Enquanto os flavivírus, como gênero, apresentam uma ampla distribuição geográfica, as es-

pécies virais são restritas a certas regiões. O YFV é encontrado apenas em regiões tropicais e subtropicais da África e da América do Sul. O vírus da dengue é encontrado somente em áreas tropicais da Ásia, Oceania, África, Austrália, América do Sul e América do Norte. O JEV é restrito ao sudoeste da Ásia, enquanto o TBEV é encontrado na Europa e Norte da Ásia. A distribuição geográfica de uma determinada espécie de vírus está geralmente relacionada com a presença da espécie de vetor envolvida na transmissão. A origem geográfica pode ser utilizada como um dos critérios para a classificação.

– Vetores

A maioria dos flavivírus (78%) é mantida, amplificada e disseminada mediante ciclos de transmissão natural que requerem artrópodes hematófagos que transmitem o vírus para os hospedeiros vertebrados (Figura 22.4). A necessidade do vetor artrópode se dá, basicamente, em razão da ineficiência de transmissão direta entre os hospedeiros vertebrados. Não há evidência do desenvolvimento de doença nos hospedeiros invertebrados após a infecção, sugerindo que a interação do vírus com o inseto é bem equilibrada. Os vetores mais comumente utilizados pelos vírus do gênero *Flavivirus* são os mosquitos (50%), seguidos pelos carrapatos (28%).

– Hospedeiros

O espectro de hospedeiros dos flavivírus inclui uma variedade de espécies de vertebrados e de artrópodes. Os artrópodes adquirem a infecção ao ingerir o sangue de um vertebrado infectado e são responsáveis pela manutenção desses vírus na natureza (Figura 22.4). Os ciclos de transmissão natural serão discutidos posteriormente, nas características ecológicas.

– Apresentação clínica

Os flavivírus variam amplamente no seu potencial patogênico. Mais de 50% produzem doença clínica em humanos e muitos são patogênicos para diferentes espécies animais, como aves, suínos, eqüinos, caninos, *grouse* (espécie de ave do Hemisfério Norte) e musaranhos. Os flavivírus patogênicos podem ser divididos em três categorias maiores: aqueles que produzem infecção no sistema nervoso central (SNC), acompanhada de meningoencefalite (WNV e SLEV); os associados com febre, artralgia e eritemas (dengue), e aqueles associados com febre hemorrágica (YFV).

– Características ecológicas

A maioria dos flavivírus é mantida na natureza por meio da replicação alternada em hospe-

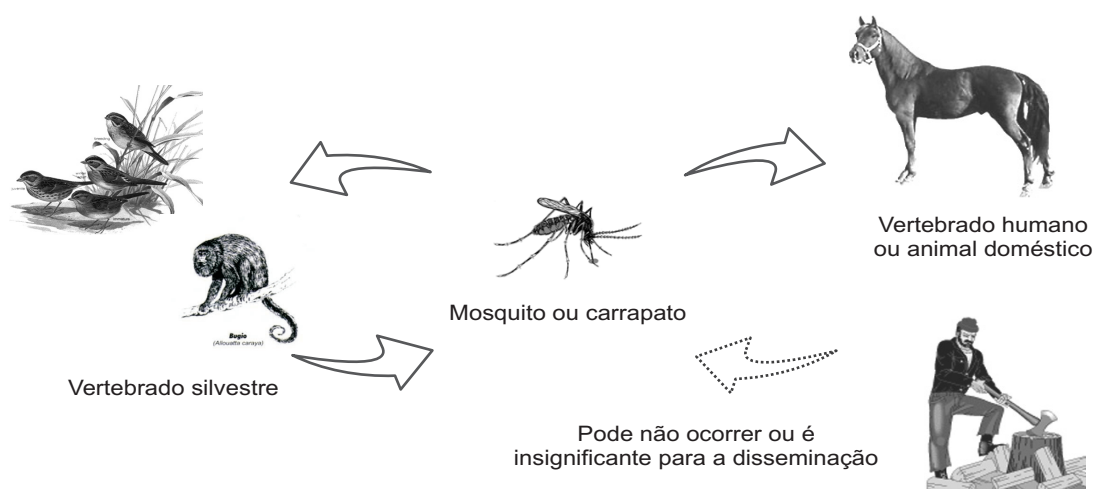


Figura 22.4. Ciclo de transmissão natural dos flavivírus. O vírus é mantido em ciclos alternados em aves, mamíferos silvestres e mosquitos e apenas ocasionalmente é transmitido para o homem ou para animais domésticos.

deiros invertebrados (artrópodes hematófagos) e em vertebrados (Figura 22.4). Como descrito anteriormente, os vetores invertebrados se infectam ao ingerir o sangue de um vertebrado infectado. O vírus replica nos tecidos do vetor e, após alguns dias, pode ser transmitido a outro hospedeiro vertebrado pela picada do inseto que inocula o agente juntamente com a saliva. Os principais hospedeiros vertebrados, para a maioria dos flavivírus, são diferentes espécies de pássaros ou de mamíferos silvestres. A infecção de humanos ou de animais domésticos é tipicamente incidental e não é necessária para a manutenção do vírus na natureza. No entanto, esporadicamente, pode-se observar transmissão do agente entre humanos e entre animais domésticos. A exceção é o vírus da dengue, que é mantido em populações humanas pela transmissão por mosquitos.

Nos demais flavivírus, os níveis de viremia, durante a infecção aguda em mamíferos domésticos, são geralmente baixos. No entanto, estes podem representar uma fonte potencial de infecção para os humanos. Por exemplo, vacas, cabras e ovelhas podem excretar o vírus pelo leite e este ser um veículo para a infecção de humanos.

A epidemiologia dos flavivírus é diferente entre os diferentes gêneros e mesmo entre os membros de um mesmo gênero, e é bastante complexa em alguns vírus. Ou seja, vários fatores precisam estar presentes para que ocorra a infecção em um indivíduo ou em um rebanho. Alguns flavivírus dependem de diferentes espécies de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Para outros, o ciclo de transmissão permanece não esclarecido. Enquanto muitos requerem artrópodes como vetores, 12% das espécies de flavivírus conhecidas são agentes com potencial zoonótico e são transmitidas entre roedores e morcegos e não se tem conhecimento de nenhum vetor artrópode.

Os flavivírus replicam *in vitro* em uma variedade de células de mamíferos, de aves e de insetos. A replicação em células de vertebrados é, geralmente, acompanhada de citopatologia severa e lise celular, embora alguns tipos celulares possam apresentar uma infecção persistente. Ao contrário, a infecção de células de mosquitos é geralmente não-citopática e infecções persisten-

tes são facilmente estabelecidas. A indução de citopatologia em algumas dessas células é uma exceção. A infecção dos vetores artrópodes é geralmente crônica e os insetos permanecem infectados por toda a vida.

Flavivírus de importância veterinária

Historicamente, os vírus Louping ill, Wesselsbron (WBV) e da encefalite japonesa (JEV) são considerados os mais importantes dentro do gênero *Flavivirus* do ponto de vista da medicina veterinária. Mais recentemente, o WNV tem expandido a sua distribuição geográfica e tem sido associado com um número expressivo de casos em vertebrados. A Tabela 22.2 apresenta as principais características dos flavivírus de importância veterinária.

4.1.1 Vírus da Louping ill

O vírus da Louping ill causa uma encefalomielite que foi observada inicialmente em ovinos. Ocorre mais frequentemente no verão e no inverno e a sua denominação se dá pelo andar saltitante dos animais infectados. Embora originalmente isolado na Escócia e na Inglaterra, o vírus encontra-se amplamente distribuído no continente europeu. O ciclo de transmissão envolve o carrapato *Ixodes ricinus* como vetor. Este vírus pode infectar várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, e os ovinos são os hospedeiros principais.

Os animais infectados se tornam virêmicos e desenvolvem uma resposta febril bifásica. O segundo pico febril ocorre juntamente com o aparecimento dos sinais clínicos que incluem ataxia, hiperexcitabilidade, tremores e paralisia. As ovelhas que desenvolvem sinais nervosos dificilmente sobrevivem. Nas demais espécies, o desenvolvimento dos sinais clínicos está geralmente associado com a idade, com o *status* nutricional e com a ocorrência de infecções secundárias.

A confirmação do diagnóstico pode ser feita pelo isolamento viral a partir do SNC, por sorologia e pela histopatologia do encéfalo. O isolamento do vírus pode ser realizado em cultivo celular ou pela inoculação intracerebral em camundon-

Tabela 22.2. Vírus do gênero *Flavivirus* associados com enfermidades de importância veterinária.

Vírus	Vetores	Espécie afetada	Apresentação clínica	Ocorrência
Encefalite japonesa (JEV)	Mosquitos	Eqüinos, suínos	Encefalite, nascimento de leitões fracos e inviáveis	Ásia
Louping ill	Carrapatos	Principalmente ovinos, mas também humanos, bovinos, suínos, eqüinos, cervídeos e <i>red grouse</i> cativos	Encefalite	Escócia, Irlanda do Norte
Wesselsbron (WBV)	Mosquitos	Principalmente ovinos, mas também humanos, bovinos, caprinos, suínos, eqüinos, mulas, camelos, cobaias, coelhos, cães e aves silvestres	Abortos, hepatite, hemorragias, malformações congênitas	África
Nilo Ocidental (WNV)	Mosquitos	Principalmente pássaros, mas também causa doença importante em humanos e eqüinos. Infecta + de 30 espécies de invertebrados e + de 150 espécies de aves.	Encefalite, doença febril	África, Europa, Estados Unidos, México, norte da América Central
Israel turkey meningoencephalitis	Mosquitos	Perus	Encefalite	Israel
Kunjin	Mosquitos	Eqüinos	Encefalite	Austrália
Murray Valley (MVEV)	Mosquitos	Eqüinos	Encefalite	Austrália

gos. O controle da enfermidade é baseado na imunização dos cordeiros, tratamento de ovelhas para evitar a infestação pelos carrapatos vetores e controle ambiental para reduzir a população de carrapatos.

4.1.2 Vírus Wesselbron

O vírus Wesselbron (WBV) é encontrado no continente africano, é transmitido pelos mosquitos *Aedes cavallus* e *Aedes ciculuteolus* e apresenta um amplo espectro de hospedeiros (Tabela 22.2). A doença reprodutiva associada ao WBV praticamente só ocorre em ovinos e é caracterizada por abortos e por morte neonatal. A infecção nas ovelhas é geralmente subclínica. Fetos abortados podem apresentar artrogripose, hidrocefalia, porencefalia e hipoplasia cerebelar. Malformações congênitas raramente são observadas. Infecção aguda fatal em cordeiros pode cursar com anorexia, letargia, fraqueza, depressão nos flancos e aumento da frequência respiratória. A resposta febril é geralmente bifásica, com o segundo pico febril de maior duração (3-6 dias). Os bovinos po-

dem ocasionalmente ser infectados e vacas prenhes podem apresentar aborto ou parir bezerras fracos e/ou inviáveis.

O diagnóstico pode ser realizado pelo isolamento viral e por testes de soroneutralização (SN). O isolamento viral é realizado pela inoculação intracerebral em camundongos lactentes. Como medida de controle, uma vacina viva modificada tem sido utilizada. No entanto, esta vacina não é recomendada para uso em animais prenhes e sua eficácia é questionada. Por essas razões, as medidas de controle são basicamente direcionadas ao controle dos mosquitos vetores.

4.1.3 Vírus da encefalite japonesa

O vírus da encefalite japonesa (JEV) utiliza mosquitos como vetores para a sua transmissão e encontra-se amplamente distribuído na Ásia, com recente expansão para o norte da Austrália. O JEV é antigenicamente relacionado com o SLEV e com o WNV. A encefalite japonesa é uma doença de importância primária em humanos, embora o vírus possa acometer também eqüinos e causar

aborto em suínos. O ciclo biológico desse vírus envolve mosquitos do gênero *Culex*, pássaros e mamíferos. Na epidemiologia, a espécie suína pode funcionar como a principal espécie amplificadora do vírus.

A infecção em eqüinos produz enfermidade com sinais clínicos moderados a fatais, depois de 8 a 10 dias após a infecção. Os sinais neurológicos são similares aos descritos nas demais encefalites e podem incluir: cegueira, ataxia, dificuldade de deglutição, andar irregular, incoordenação, andar em círculos, estupor e coma. A infecção em suínos adultos é geralmente subclínica e o seu impacto nessa espécie deve-se à transmissão transplacentária, cuja patogenia é muito semelhante à da infecção pelos parvovírus. As consequências da infecção transplacentária incluem aborto, mumificação fetal, nascimento de leitões com sinais neurológicos e nascimento de animais aparentemente saudáveis.

4.1.4 Vírus do Nilo Ocidental

O vírus do Nilo Ocidental (*West Nile virus*, WNV) foi, inicialmente, identificado em uma mulher com quadro febril em uma província da Uganda, África, em 1937. A província era denominada *West Nile* (Nilo Ocidental), daí a denominação da doença e do agente. Nas décadas seguintes, o WNV foi reconhecido como um dos arbovírus mais difundidos em pássaros, mosquitos e humanos, com distribuição em algumas regiões da África, no Oriente Médio, Europa Mediterrânea, Índia, em algumas regiões da Ásia e Austrália. A grande maioria das infecções humanas nessas regiões, no entanto, era subclínica ou acompanhada de sinais clínicos leves. Surto importantes em humanos ocorreram em Israel (1951-1954, 1957) e na África do Sul (1974).

Evidências sorológicas da infecção em eqüinos datam de 1956 (Egito) e 1960 (Israel), e os primeiros relatos clínicos da doença nessa espécie foram realizados no Egito, em 1963. Desde então, surtos de doença febril e neurológica em eqüinos têm sido ocasionalmente descritos no Oriente Médio, norte da África e em países europeus mediterrâneos. A partir da década de 1990, os relatos de doença humana – muitas vezes severa – au-

mentaram, a infecção e a doença foram relatadas em várias espécies animais e em áreas até então aparentemente livres do agente. Nas últimas décadas, epizootias da doença causada pelo WNV em eqüinos têm sido descritas em Marrocos (1996 e 2003), Itália (1998), Israel (2000), Sul da França (2000, 2003, 2004), além de evidência sorológica da circulação de vírus relacionados em vários outros países europeus, asiáticos e da Oceania.

O marco histórico da doença do Nilo Ocidental foi a sua introdução em Nova Iorque, em 1999, quando causou mortalidade em pássaros de vida livre e de zoológicos e provocou doença em 67 pessoas, provocando a morte de 21. A partir daí, o vírus se disseminou rapidamente por praticamente todos os estados norte-americanos, provocando infecção e doença em uma variedade de pássaros silvestres, mamíferos silvestres e domésticos (especialmente eqüinos) e também em humanos. Até maio de 2007, a infecção foi relatada em 24 mil pessoas (752 mortes) e causou doença em mais de 25.000 eqüinos (mortalidade aproximada de 35-40%). Esses números provavelmente ultrapassam em magnitude os números até então relatados para a enfermidade, durante décadas, nas regiões de origem. Concomitantemente com a sua difusão na direção oeste nos EUA, a infecção avançou na direção norte (Canadá) e está avançando na direção sul (México, América Central e Caribe). Nos últimos anos, evidências sorológicas indicam a presença da infecção em eqüinos e muare na Colômbia (2004-2005), e o vírus já foi identificado em casos de doença neurológica em eqüinos na Argentina (2006).

A rápida e explosiva disseminação do WNV, nos EUA, permitiu o conhecimento (ou o surgimento) de padrões epidemiológicos até então ignorados, como a notável amplitude de vetores e hospedeiros vertebrados susceptíveis ao vírus, além do reconhecimento de novas formas de transmissão. Até o presente, a infecção natural ou experimental pelo WNV já foi demonstrada em mais de 150 espécies de aves – passeriformes ou não – e em várias espécies de mamíferos domésticos e de vida livre, anfíbios e répteis, além de humanos. Dentre as espécies de interesse veterinário, os eqüinos apresentam importância peculiar, pois são muito susceptíveis à infecção natural e,

freqüentemente, desenvolvem um quadro severo de encefalite. No entanto, a infecção também tem sido demonstrada em outros mamíferos e aves de criação.

4.1.4.1 O agente

O WNV pertence ao complexo antigênico do JEV e SLEV e apresenta reatividade sorológica cruzada com vários vírus desse complexo, o que dificulta o seu diagnóstico por métodos imunológicos. Os isolados do WNV podem ser divididos em duas linhagens genéticas: os vírus da linhagem 1 circulam na América do Norte (desde 1999), Europa, Ásia e Austrália; os vírus da linhagem 2 têm sido isolados da África subsariana e Madagascar. Os vírus da linhagem 1 podem ser divididos em quatro clãs, que possuem distribuição geográfica e virulência distintas; os isolados norte-americanos pertencem ao clã B e são altamente virulentos para camundongos, ao contrário da maioria dos outros vírus das duas linhagens.

O WNV, introduzido nos Estados Unidos em 1999, possui uma alta homologia de nucleotídeos (99,7%) com um vírus isolado de surtos em Israel poucos anos antes, o que indica a sua provável origem. Esse vírus apresenta virulência para corvos americanos (*Corvus brachyrhynchos*) e para outras espécies de pássaros (pardais, pássaros cantores), o que o distingue de outros WNV que circulam na África e Austrália. Isolados atenuados do WNV, provavelmente descendentes do vírus original introduzido nos EUA, têm sido identificados em aves em alguns estados norte-americanos e na América Central. É provável que esta variação genotípica e fenotípica se constitua em um reflexo da adaptação gradativa do WNV aos novos hospedeiros. Assim, diferenças genotípicas e fenotípicas (virulência, preferência por vetores, adaptação a novos hospedeiros) possivelmente serão identificadas em isolados do WNV das Américas nos próximos anos.

4.1.4.2 Epidemiologia

Um resumo da distribuição geográfica do WNV, com base em relatos clínicos, virológicos e

sorológicos foi apresentada no início desta seção. A rápida expansão da infecção nas Américas, sobretudo na direção oeste e sul, sugere que novos casos clínicos ou evidências sorológicas provavelmente serão relatados nos próximos anos nas Américas Central e do Sul. As condições ecológicas nessas regiões (clima, flora e fauna) são propícias para a introdução e manutenção do agente em ambientes silvestres, com exposição ocasional de animais domésticos e humanos, como tem ocorrido nos EUA.

A exemplo de outros flavivírus, o WNV é transmitido primariamente por insetos hematófagos – sobretudo mosquitos –, que adquirem o vírus ao realizarem o repasto sangüíneo em aves virêmicas, consideradas os reservatórios naturais do agente. Os insetos são capazes de transmitir o agente após um período de incubação intrínseco, no qual o vírus replica em seus tecidos. Os principais vetores de transmissão do WNV são as várias espécies de mosquitos do gênero *Culex* sp., embora outros mosquitos possam também ter alguma participação na transmissão. Dentre as dezenas de espécies de *Culex*, existem diferenças na eficiência de transmissão do agente. Nos Estados Unidos, já foram identificadas aproximadamente 60 espécies de *Culex* capazes de transmitir o WNV, porém menos de 10 são consideradas importantes na transmissão do vírus. Espécies de *Culex* exclusivamente ornitofílicas transmitem o vírus apenas entre aves. No entanto, algumas espécies realizam repasto tanto em aves como em mamíferos, podendo transmitir o vírus de aves virêmicas para mamíferos e humanos. Já foi demonstrada a transmissão transovariana do vírus nos insetos, assim como a sua presença em fêmeas hibernando. Isto pode explicar a permanência do agente após o inverno em regiões temperadas ou frias.

Os hospedeiros naturais do WNV na natureza são aves silvestres de diferentes espécies. A infecção natural já foi demonstrada em mais de 150 espécies de aves silvestres e domésticas em todo o mundo. As aves apresentam uma grande variabilidade de susceptibilidade à infecção e doença pelo WNV e também apresentam potencial distinto de transmissão. Assim, os corvídeos, passeriformes (pássaros cantores, rabos-de-palha,

pardais), chadriiformes (aves de banhados), corujas e falconiformes desenvolvem níveis de viremia suficientes para infectar uma grande parcela dos mosquitos que realizam o repasto sangüíneo. Pombos, pica-paus, gansos, marrecos e patos não desenvolvem altos títulos de vírus no sangue e, assim, não infectam uma parcela significativa dos mosquitos. Corvídeos, gralhas e pardais são altamente infecciosos para mosquitos e também apresentam mortalidade de aproximadamente 40% quando infectados. Os chadriiformes (aves pernaltas de regiões alagadiças) e anseriformes (ganso doméstico) são altamente susceptíveis à infecção e enfermidade. Os psitacídeos e galináceos são menos susceptíveis. O papel de aves migratórias na disseminação do WNV ainda é desconhecido, mas a rápida difusão do vírus nas Américas aponta para uma provável participação dessas aves.

Os níveis de viremia desenvolvidos por eqüinos e humanos – além de outros mamíferos – não são suficientes para infectar eficientemente os mosquitos e proporcionar a transmissão. Assim, estas espécies não participam da transmissão do agente através de vetores. Outras formas de transmissão, pouco freqüentes e de importância epidemiológica questionável, já foram descritas. Algumas espécies de rãs e répteis (crocodilos jovens), além de *hamsters*, podem desenvolver níveis de viremia compatíveis com a transmissão através de mosquitos, mas o seu papel na transmissão natural do vírus é desconhecido.

O caráter epidêmico e o grande número de pessoas infectadas nos EUA permitiram o reconhecimento de novas formas de transmissão até então ignoradas. Assim, foi demonstrado que o WNV pode ser transmitido de mães virêmicas para os fetos através da placenta e também para os recém-nascidos, pelo colostro e leite. O vírus pode ser transmitido por transfusão sangüínea e também por transplantes de órgãos. Essas formas provavelmente não possuem importância epidemiológica em áreas endêmicas, mas devem ser consideradas em situações de epidemias. Há também relatos de infecção de técnicos de laboratório que, acidentalmente, se inocularam o agente durante a manipulação laboratorial.

Em animais, a transmissão do WNV sem o envolvimento de mosquitos foi demonstra-

da em aves que ingeriram carcaças de pássaros infectados; em crocodilos inadvertidamente alimentados com carcaças de eqüinos infectados; e entre perus criados em condições intensivas, provavelmente através de aerossóis. A transmissão por contato direto ou indireto com secreções e excreções de aves virêmicas foi demonstrada experimentalmente (entre aves e entre crocodilos) e pode ocorrer sob determinadas condições na natureza. Apesar dessas outras formas já terem sido demonstradas, a transmissão por mosquitos é a mais importante e a principal responsável pela circulação do vírus na natureza.

4.1.4.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Várias espécies de aves e mamíferos são susceptíveis à infecção natural pelo WNV, e a susceptibilidade de outras diversas espécies foi demonstrada experimentalmente. Dentre as espécies infectadas naturalmente que desenvolveram a doença, podem ser citados crocodilos, alpacas, cães, ovinos cervídeos e lobos. Sorologia positiva em níveis variáveis tem sido detectada em ursos, canídeos silvestres, coelhos silvestres, lêmures, camelos e primatas não-humanos cativos, entre outros. De particular interesse foi um surto ocorrido em uma criação comercial de, aproximadamente, 10.000 crocodilos, dos quais 1.250 morreram após um curso clínico com sinais neurológicos. A infecção foi provavelmente introduzida na criação em carcaças de eqüinos utilizadas para alimentar os crocodilos. Em ovinos, alpacas, cães e lobos, a enfermidade neurológica também foi esporadicamente relatada. Várias outras espécies foram infectadas experimentalmente com sucesso, o que estende consideravelmente o espectro de possíveis hospedeiros do WNV.

Esta seção se concentrará na descrição da enfermidade em eqüinos, aves e humanos, nos quais a infecção possui maior repercussão sanitária e epidemiológica.

a) Eqüinos: os eqüinos são particularmente susceptíveis à infecção pelo WNV e freqüentemente desenvolvem uma enfermidade aguda com comprometimento neurológico. Apesar de

sua alta susceptibilidade, os eqüinos não produzem níveis de viremia suficientes para infectar insetos e, assim, servir de amplificadores do vírus. Ou seja, os eqüinos infectados não disseminam o vírus através de insetos hematófagos. Evidências sorológicas indicam que a maioria das infecções em eqüinos é assintomática ou leve, passando despercebida por criadores e tratadores. Acredita-se que apenas 15-20% das infecções resulte em manifestações clínicas, após um período de incubação de 3 a 14 dias. Após a replicação inicial nas proximidades do sítio de inoculação, o vírus alcança os linfonodos regionais e, subseqüentemente, o sangue, através do qual invade o SNC após atravessar a barreira hematoencefálica. No SNC, o vírus infecta e destrói neurônios e também outras células, o que contribui para a sintomatologia neurológica. A maioria das infecções não-fatais é seguida da erradicação do vírus do organismo pelo sistema imunológico.

Os sinais clínicos variam entre os surtos e entre os animais afetados. Os sinais mais comumente relatados são: anorexia, fraqueza, depressão, incoordenação, ataxia e decúbito. Hipertermia nem sempre está presente. Bruxismo, andar em círculos, hiperexcitabilidade, pressionamento da cabeça contra anteparos e convulsões também têm sido relatados. As taxas de letalidade em eqüinos variam entre 25 e 45%. No surto ocorrido nos EUA, em torno de 1/3 dos animais morreu ou foi sacrificado devido à sua extrema condição. Animais que sobrevivem 2-3 semanas após o aparecimento dos sinais geralmente se recuperam;

b) Aves: a infecção pelo WNV já foi detectada em mais de 150 espécies de aves domésticas e silvestres. A susceptibilidade das aves à infecção varia amplamente de acordo com a espécie. Dentre as espécies domésticas, os gansos são os mais susceptíveis e, freqüentemente, desenvolvem doença neurológica quando infectados. Taxas de mortalidade de 25 a 40% têm sido relatadas em infecções naturais, e de até 75% em infecções experimentais. Por outro lado, galináceos e psitacídeos estão entre as espécies menos susceptíveis à infecção. Dentre as espécies silvestres, os passeriformes (pássaros de várias espécies, entre os quais os pardais, rabos-de-palha, pássaros cantores), corvídeos e charadriiformes

(aves pernaltas de banhados) são as mais susceptíveis. Essas espécies desenvolvem altos níveis de viremia e excretam grandes quantidades de vírus. Nas aves que desenvolvem a doença, os sinais característicos incluem depressão, letargia, penas arrepiadas, além de sinais neurológicos como: ataxia, paralisia, movimentos de pedagem, torcicolo, opistótono e incoordenação. A morte geralmente sobrevém em menos de 24 horas. As taxas de mortalidade são geralmente elevadas. Em pardais e corvídeos, mais de 50% dos animais que manifestam sinais clínicos vão a óbito. Além da espécie, fatores como a idade das aves e a cepa viral influenciam nas conseqüências clínico-patológicas da infecção. Acredita-se que a infecção seja subclínica ou leve em grande parte das espécies de aves infectadas naturalmente;

c) Humanos: a exemplo dos eqüinos, aproximadamente 80% das infecções humanas pelo WNV são subclínicas. Dentre os pacientes que desenvolvem a doença, a grande maioria apresenta uma doença aguda autolimitante, caracterizada por hipertermia, cefaléia, fadiga, dores musculares e fraqueza. Algumas pessoas apresentam sinais gastrintestinais, pequenas manchas avermelhadas na pele e eritemas. Rigidez e dor no pescoço, dificuldade de concentração também têm sido relatados e podem perdurar por semanas e até meses. A doença neuroinvasiva (meningite, encefalite) ocorre em menos de 1% das pessoas infectadas, e é mais comum em idosos e em pessoas imunocomprometidas. A severidade da doença neurológica varia desde desorientação leve até coma e morte. No surto ocorrido nos EUA, 9% das pessoas que apresentaram doença neuroinvasiva foram a óbito. Aproximadamente 10% dos pacientes que apresentam doença neurológica desenvolvem paralisia flácida, semelhante à da poliomielite.

4.1.4.4 Diagnóstico

Para o diagnóstico, amostras do encéfalo devem ser utilizadas na tentativa de isolamento viral. Em aves, podem-se utilizar amostras de rim, coração, cérebro e intestino. O isolamento viral pode ser realizado em células Vero ou em células de rim de coelho (RK-13). Após a produção

de efeito citopático (ECP), a identidade do agente pode ser confirmada por IFA ou IPX, ou, ainda, por neutralização com anti-soro específico. Para a detecção de ácidos nucleicos virais em tecidos, pode-se utilizar a técnica de RT-PCR; e o teste de imunoistoquímica para detecção de antígenos. Anticorpos podem ser detectados no soro de eqüinos através do teste ELISA, de HI e testes de redução de placa (PRA). Os métodos de HI e PRA são os mais utilizados para detecção de anticorpos no soro de aves. Em alguns testes sorológicos, pode ocorrer reação cruzada com flavivírus relacionados, como SLEV e JEV.

Em eqüinos, o diagnóstico diferencial deve considerar outras enfermidades que cursam com depressão e sinais neurológicos, como as encefalites do leste, oeste e venezuelana, raiva e tripanosomíase.

4.1.4.5 Controle e profilaxia

A vacinação sistemática é o meio mais efetivo de proteger eqüinos da infecção e doença em áreas endêmicas. Nos EUA, já existem algumas vacinas licenciadas para uso em eqüinos, porém ainda não existem vacinas comerciais para humanos ou aves. O aumento da importância da enfermidade, a partir de sua introdução e disseminação na América do Norte, resultou na intensificação na pesquisa e desenvolvimento de vacinas para proteger animais domésticos – especialmente eqüinos e gansos – e também humanos. Além de proteger espécies economicamente importantes da doença, a vacinação deve reduzir os níveis de viremia e, assim, reduzir também as oportunidades de transmissão por vetores.

Até 2007, vacinas convencionais inativadas, atenuadas e recombinantes haviam sido desenvolvidas e testadas em eqüinos. Dessas, quatro já foram disponibilizadas comercialmente nos EUA. Em geral, as vacinas testadas conferem boa proteção contra doença clínica e também reduzem os níveis de viremia. A vacina mais promissora, no entanto, já disponível no comércio dos EUA e em outros países, é uma vacina recombinante, na qual os genes que codificam as proteínas de envelope do WNV foram introduzidas no genoma do poxvírus do canário, que é, então, utilizado para

imunizar os animais. Em estudos experimentais, essa vacina foi capaz de proteger de viremia 100% dos eqüinos desafiados 30 dias após a vacinação e 90% daqueles desafiados um ano após a imunização, sendo que nenhum animal desenvolveu sinais clínicos. Vacinas de DNA e também vacinas vivas recombinantes, utilizando a cepa vacinal 17D do vírus da febre amarela (YFV) como vetor, têm sido desenvolvidas e testadas em animais de laboratório. Vacinas para uso humano e em aves domésticas de importância econômica também estão em desenvolvimento e podem ser licenciadas nos próximos anos.

Além da vacinação, medidas de combate aos vetores e que visem minimizar a exposição de pessoas e animais aos insetos têm sido recomendadas em áreas endêmicas. Além dessas medidas, o uso de inseticidas, larvicidas, repelentes (para uso em eqüinos) e dispositivos para reduzir o acesso dos vetores, e de telas de proteção para evitar o acesso de aves a instalações animais tem sido preconizado. Locais propícios para a reprodução de mosquitos (depósitos de água) devem ser investigados e combatidos. Lâmpadas que não atraem insetos devem ser preferencialmente utilizadas em estábulos, além do uso de telas nas aberturas. Deve-se também evitar o contato de quaisquer tipos de aves – sejam domésticas ou silvestres – com os eqüinos. Essas medidas reduzem a probabilidade de contato dos animais domésticos com os vetores, mas não eliminam totalmente o risco de transmissão.

Em áreas livres que apresentem o risco de introdução do agente, o monitoramento sorológico de aves silvestres e também de eqüinos pode ser útil para detectar, de forma precoce, a eventual introdução da infecção e, assim, desencadear a tomada de medidas pertinentes. Para isso, um sistema ágil de coleta de amostras e de testes laboratoriais se faz necessário.

4.2 Gênero *Pestivirus*

As espécies reconhecidas e em fase de reconhecimento que pertencem ao gênero *Pestivirus* estão descritas no Tabela 22.3. O vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) são importantes patógenos de su-

ínos e bovinos, respectivamente, e estão presentes em todos os continentes. O vírus da doença da fronteira de ovinos (BDV) possui importância limitada. Outros pestivírus recentemente identificados aguardam classificação definitiva (Tabela 22.3).

Tabela 22.3. Espécies de vírus classificadas no gênero *Pestivirus*.

Espécie	Abreviatura	Hospedeiro
Vírus da peste suína clássica	CSFV	Suínos, ovinos?
Vírus da diarreia viral bovina tipo 1	BVDV- 1	Ruminantes domésticos e silvestres, suínos
Vírus da diarreia viral bovina tipo 2	BVDV- 2	Ruminantes domésticos e silvestres, suínos
Vírus da doença da fronteira dos ovinos	BDV	Ovinos, caprinos, cervídeos, suínos?
Espécies virais provisórias		
Vírus Giraffe		Girafas
Vírus HoBi		Bovinos?
Vírus Pronghorn		Antílope Pronghorn

Apenas três dos critérios utilizados para diferenciar espécies do gênero *Flavivirus* são utilizados para diferenciar os pestivírus: hospedeiro de origem, reatividade sorológica e homologia de nucleotídeos do genoma. Os critérios ecológicos, espécie e distribuição geográfica dos vetores não são utilizados, pois esses vírus não são transmitidos por insetos. O critério da apresentação clínica não é utilizado, pois variações das cepas dentro das espécies podem afetar a apresentação clínica (p. ex.: existem cepas de alta e baixa virulência do CSFV). Além disso, a infecção por diferentes espécies de pestivírus pode determinar quadros clínicos semelhantes (p. ex.: malformações congênitas em ovinos podem ocorrer tanto pela infecção transplacentária pelo BDV como pelo BVDV).

Assim, a classificação das espécies dos pestivírus utiliza três critérios:

a) hospedeiro de origem: é o critério mais problemático a ser estabelecido e pode não se constituir em um indicador definitivo para a diferenciação. Os pestivírus foram originalmente classificados como BVDV, CSFV e BDV, baseados na espécie hospedeira da qual foram isolados.

Este critério de classificação é complicado, pois alguns pestivírus não são restritos a um único hospedeiro. O BVDV, por exemplo, é capaz de infectar bovinos, ovinos e também suínos;

b) características antigênicas e reatividade sorológica cruzada: todos os pestivírus são antígenicamente relacionados. No entanto, os títulos de anticorpos neutralizantes no soro de animais previamente expostos são geralmente médios a altos frente à espécie homóloga e baixos (ou mesmo não reativos) frente às demais espécies; ou seja, a reatividade sorológica cruzada entre as espécies de pestivírus é baixa e pode ser bastante variável também entre diferentes isolados de uma mesma espécie viral. Anticorpos monoclonais (AcMs) podem ser utilizados para diferenciar as espécies de pestivírus;

c) homologia entre as sequências de nucleotídeos: a comparação entre as sequências de nucleotídeos é o critério mais seguro para diferenciar as espécies de pestivírus. A região 5'UTR é a mais comumente utilizada para a detecção e caracterização de variações no genoma, uma vez que apresenta segmentos altamente conservados, o que facilita a amplificação por PCR. No entanto, como a região da N^{pro} é única dos pestivírus, ela se constitui na região de eleição para a comparação e caracterização inicial de isolados. A análise filogenética das sequências que codificam a N^{pro} revelou sete grupos genéticos principais dentro do gênero *Pestivirus* (Figura 22.5). Quatro desses ramos correspondem às quatro espécies conhecidas: BVDV-1, BVDV-2, BDV e CSFV. Os três ramos restantes correspondem a um pestivírus isolado de girafa, de um isolado de antílope e um ramo composto por três vírus, sendo um isolado brasileiro de soro fetal bovino, um isolado contaminante de cultivo celular e outro isolado brasileiro de búfalo.

Além do genótipo, as cepas de pestivírus podem ser agregadas em subgenótipos. Dois subgenótipos dentro do BVDV-1 (BVDV-1a e BVDV-1b) e do BVDV-2 (BVDV-2a e BVDV-2b) têm sido descritos nas Américas do Norte e do Sul. Uma diversidade maior é observada entre as cepas europeias nos sete diferentes subgenótipos reportados. A importância prática da existência desses subgenótipos ainda precisa ser esclarecida.

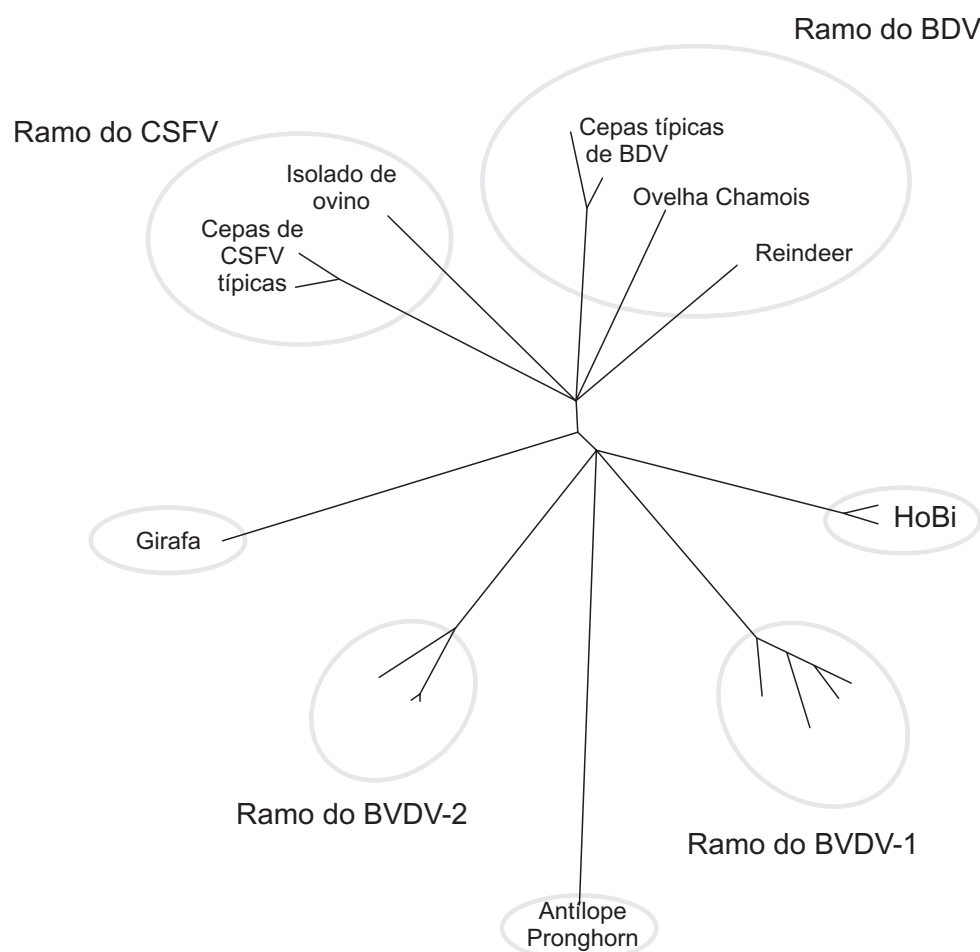


Figura 22.5. Agrupamento filogenético de isolados de pestivírus com base na homologia de nucleotídeos do gene da proteína N^{pro}.

A infecção pelos pestivírus, em geral, pode resultar tanto em infecções agudas como em infecções persistentes. A infecção persistente é resultante da habilidade desses vírus em atravessar a placenta e estabelecer infecção e imunotolerância no feto. A infecção transplacentária, seguida do nascimento de animais persistentemente infectados (PI), pode ocorrer nas infecções por qualquer dos pestivírus. No entanto, os animais PI do BVDV parecem desempenhar um papel mais importante na epidemiologia da infecção e são considerados os mantenedores desse vírus na natureza.

Biotipos dos pestivírus

Embora não sejam utilizados para diferenciar as espécies, dois biotipos existem entre os

pestivírus: os vírus citopáticos (cp) e os não-citopáticos (ncp). Os vírus ncp constituem-se na maioria dos isolados de campo e são capazes de produzir infecções persistentes em fetos. Os vírus cp se originam dos ncp por mutações e rearranjos genéticos. Embora as diferenças nos biótipos tenham sido inicialmente observadas em laboratório, posteriormente também foi demonstrada a sua importância prática. Cepas de BVDV ncp podem estabelecer infecções persistentes em fetos infectados entre os dias 40 e 120 de gestação. Esses animais nascem PI e, se forem superinfectados com uma amostra de BVDV cp antígenicamente semelhante, podem desenvolver a doença das mucosas (DM), que é uma forma altamente fatal da infecção.

4.2.1 Vírus da peste suína clássica

O vírus da peste suína clássica (CSFV) é um patógeno importante de suídeos e causa doença severa tanto em suínos domésticos como silvestres. Com exceção de alguns países de onde foi erradicada, a enfermidade possui ampla distribuição e, aproximadamente, 70 países reportaram a ocorrência de surtos entre 1994 e 2005. A CSF é uma doença altamente contagiosa e de difícil combate em áreas de alta concentração de criações comerciais ou com população numerosa de suídeos silvestres. Por isso é considerada uma doença estratégica do ponto de vista sanitário pela Organização Internacional de Epizootias (OIE).

Os pestivírus são antigenicamente relacionados e um soro policlonal reage contra todos os membros do gênero, mas não com membros de outros gêneros da *Flaviviridae*. No entanto, o uso de MAbs específicos para a E2 e E^{rns} permitiu a identificação de até 21 subtipos antigênicos do CSFV até o presente.

Isolados antigenicamente distintos são encontrados em regiões diferentes em épocas diversas. Por outro lado, o vírus apresenta uma taxa de mutação relativamente baixa e os isolados obtidos de surtos subseqüentes em uma mesma região são muito semelhantes entre si. Por isso, a análise filogenética de isolados de campo tem sido muito utilizada como suporte em estudos epidemiológicos e na identificação da origem de isolados envolvidos em novos surtos. A análise filogenética de CSFV isolados de diferentes continentes permitiu a identificação de três grupos genéticos e de vários subgrupos dentro de cada grupo. Os isolados do grupo 3 ocorrem apenas na Ásia; todos os vírus isolados na década de 1990 em países europeus pertencem ao grupo 2 e são diferentes das cepas de referência. Os isolados do grupo 1 parecem circular predominantemente na Rússia, embora já tenham sido identificados também em Cuba.

4.2.1.1 Epidemiologia

Afora os países que já erradicaram o CSFV e aqueles que estão em vias de erradicação, o vírus

possui distribuição mundial. A CSF é endêmica em grande parte da Ásia. Na África, os dados são escassos, mas a doença já foi relatada em Madagascar. O vírus foi erradicado dos EUA, Canadá, Nova Zelândia e Austrália. Os países escandinavos já o erradicaram de suas criações comerciais, mas a existência de uma numerosa população de suídeos silvestres tem dificultado a erradicação definitiva daquele continente. Nesses países, a vacinação foi banida a partir da década de 1990, mas o vírus tem sido esporadicamente reintroduzido a partir de outros países ou da população de suídeos silvestres. Países da Europa Central e Oriental têm seguido a orientação de controle sem vacinação, mas a infecção tem sido ocasionalmente detectada, principalmente nos países menos desenvolvidos.

A infecção pelo CSFV tem permanecido endêmica em vários países da América Central e do Sul, embora a vacinação sistemática tenha reduzido drasticamente a sua ocorrência nas últimas décadas. Surtos têm ocorrido nos últimos anos em países do Caribe (Cuba e República Dominicana). O México segue com relativo sucesso com um programa de erradicação, apesar de alguns tropeços periódicos. No Brasil, a infecção era endêmica em várias regiões até a década de 1980. Programas oficiais de controle/erradicação que envolveram o uso maciço da vacina viva modificada (cepa chinesa), obtiveram sucesso e reduziram drasticamente a ocorrência da doença. Atualmente, a infecção está em vias de erradicação, e o país pode ser dividido em duas áreas epidemiologicamente distintas: a) uma área livre da doença e que concentra mais de 80% do rebanho nacional e as principais granjas e indústrias suínícolas (regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e parte da região Nordeste); e b) uma região onde ainda ocorrem focos isolados da doença, porém com baixa densidade suína e sem expressão comercial/industrial (parte da região Nordeste e região Norte). Entre 2002 e 2005, foram registrados aproximadamente seis focos nessas áreas. Em fevereiro de 2006, foi notificado um foco da enfermidade em uma criação não-comercial da Paraíba. Focos recentes de peste suína clássica foram relatados na África do Sul (2005), Alemanha (2006), Brasil (2006), Bolívia (2006), Guatemala

(2006), Croácia (2006), Equador (2007), Nicarágua (2007) e Rússia (2007). Em todos esses casos, a infecção ficou restrita a uma ou poucas propriedades e foi aparentemente controlada por ações imediatas de combate.

O conhecimento da real situação da enfermidade em muitos países é dificultado pela falta de programas oficiais efetivos de vigilância, pela existência de pressões político-econômicas, que evitam a divulgação de dados, e pelo possível efeito da vacinação em mascarar a circulação do agente e a ocorrência da doença. Por essas razões, acredita-se que a incidência real da doença supere, em muito, os relatos oficiais.

A infecção pelo CSFV ocorre principalmente por via oronasal, embora os animais possam também se infectar através de outras superfícies mucosas, da conjuntiva ou de abrasões da pele. Embora a aerossolização seja mínima a partir das excreções e secreções dos animais infectados, o vírus pode sobreviver em fômites e em ambientes contaminados por até duas semanas. Além da transmissão direta e indireta entre animais, produtos suínos frescos, congelados ou curtidados podem manter o vírus viável e servir de veículos para a infecção pela via oral. Nesse sentido, a importação de produtos suínos contaminados tem sido responsabilizada pela introdução do agente em áreas livres. A transmissão indireta através de pessoas, de animais silvestres e de fômites pode ocorrer, embora o modo exato como o vírus se dissemina entre criações ainda não seja conhecido.

4.2.1.2 Patogenia e sinais clínicos

A severidade e características da doença dependem da cepa e dose do vírus, da idade do animal e do *status* reprodutivo. O período de incubação é variável, mas geralmente varia entre 2 e 14 dias. As tonsilas se constituem nos órgãos de predileção após a exposição pela via oronasal. A partir das tonsilas, o vírus é drenado para os linfonodos regionais e daí para outros tecidos linfóides, como a medula óssea e acúmulos linfóides do trato digestivo (placas de Peyer). A replicação do CSFV nos tecidos linfóides permite que o vírus atinja a circulação sanguínea e altos títulos vi-

rais podem ser detectados no sangue periférico. Apenas tardiamente após a infecção é que o vírus invade o fígado, o pâncreas e os rins. O intervalo de tempo entre a infecção das tonsilas e o aparecimento do vírus em órgãos parenquimatosos depende da virulência da cepa viral. Cepas altamente virulentas podem ser detectadas nesses órgãos já aos seis dias após a infecção. Tanto em infecções subclínicas como em infecções clínicas, hemorragias múltiplas podem ser observadas. Essas hemorragias são mais frequentemente detectadas nos linfonodos e nos rins, mas também podem ser observadas na bexiga, na pele, no coração, na laringe e na mucosa intestinal. A frequência e a extensão das hemorragias estão associadas com a virulência da cepa viral e com a destruição de células endoteliais dos capilares sanguíneos, com a trombocitopenia e com síntese anormal de fibrinogênio.

Em rebanhos de cria infectados com cepas de baixa virulência, índices reprodutivos baixos podem ser o único sinal. Inversamente, a infecção com cepas altamente virulentas pode determinar taxas de mortalidade próximas a 100%. Os sinais clínicos iniciais resultantes da infecção por cepas de alta virulência incluem febre alta, fraqueza, anorexia e constipação seguida por diarreia. Um dos primeiros sinais da infecção clínica é conjuntivite com descarga ocular difusa. Vários dias depois, aparecem manchas avermelhadas no abdome e as orelhas podem apresentar coloração púrpura.

A recuperação dos animais infectados com cepas de alta virulência é difícil, e estes geralmente morrem uma a duas semanas após a infecção. Convulsões podem ser observadas na fase final da doença. Embora os sinais clínicos geralmente apareçam dentro de 2 a 14 dias, em alguns casos, os animais só apresentam sintomatologia após um período prolongado (superior a 30 dias).

Cepas de baixa virulência podem determinar infecções subclínicas ou leves. Os sinais clínicos, quando presentes, podem incluir perda de apetite, sonolência, fraqueza, diarreia e febre. Leucopenia é observada na grande maioria dos casos. A resposta imune desenvolvida em resposta à infecção nem sempre é efetiva para erradicar o vírus do organismo. Como consequência, os animais

podem ficar cronicamente infectados. Os sinais clínicos da infecção crônica incluem retardo do crescimento, perda de pêlos, febre, diarreia e perda de peso. Os sinais são intermitentes e podem persistir, com aumentos e reduções periódicos da severidade, por semanas ou meses. Animais cronicamente infectados são imunodeprimidos e, conseqüentemente, são mais susceptíveis a infecções por outros patógenos. Esses animais geralmente morrem em resultado da infecção pelo CSFV ou por causa de infecções secundárias. Embora a infecção crônica seja relativamente rara, é muito importante na disseminação da infecção, pois os animais infectados excretam o vírus de forma contínua.

A infecção de fêmeas prenhes freqüentemente resulta em infecção fetal e pode levar a perdas reprodutivas. As conseqüências e a severidade da infecção fetal dependem da virulência da cepa viral e da fase de gestação em que ocorre. A infecção fetal pode resultar em abortos, natimortos, nascimento de leitões fracos e inviáveis, tremor ou malformações congênitas. Fetos infectados intra-uterinamente também podem nascer saudáveis, livres do vírus ou persistentemente infectados (PI). Os animais PI apresentam viremia persistente e geralmente morrem em alguns meses.

4.2.1.3 Diagnóstico

A maioria das amostras do CSFV circulantes possui baixa virulência, o que dificulta o diagnóstico clínico, principalmente em animais adultos. Da mesma forma, a infecção pode apresentar um período de incubação de várias semanas – no caso de rebanhos – o que requer vários ciclos de amplificação até se tornar clinicamente aparente. Isso geralmente retarda o diagnóstico e a adoção de medidas de combate, e pode comprometer o sucesso dessas medidas. Por isso, um diagnóstico pré-clínico seria de enorme benefício para o combate a essa enfermidade.

Pelo fato da CSF não apresentar sinais patognômicos, o diagnóstico da enfermidade deve ser confirmado pelo isolamento viral ou pela detecção de antígenos virais no sangue ou nos tecidos. Os testes de eleição para esta finalidade são a

imunofluorescência (IFA) e ELISA. O isolamento viral é geralmente realizado em células primárias ou de linhagem suína, incluindo as células PK-15. Como a maioria dos isolados não induz citopatologia, a identificação deve ser realizada pela detecção de antígenos (IFA ou imunoperoxidase, IPX), com o uso de anticorpos policlonais ou monoclonais. A diferenciação do BVDV-1, do BVDV-2 e do BVD pode ser realizada através de testes sorológicos, pela utilização de anticorpos monoclonais ou por RT-PCR diferencial.

Nos últimos anos, as técnicas de ELISA e RT-PCR têm conquistado espaço no diagnóstico do CSFV. O ELISA é um teste rápido e simples, pode ser utilizado para triagem de animais febris ou doentes e é aplicável para se testar um número grande de amostras. A técnica de RT-PCR é mais complexa, mas pode ser útil por sua sensibilidade e rapidez, podendo ser empregada para o diagnóstico pré-clínico em estágios iniciais de surtos. Recentemente, o PCR em tempo real revelou a sua utilidade potencial no diagnóstico inicial de surtos pelo CSFV.

4.2.1.4 Profilaxia e controle

A enfermidade é altamente transmissível e de difícil controle em regiões de alta concentração de criações suínas e também em áreas que possuem populações de suídeos silvestres. A alimentação de suínos com restos de alimentos permanece sendo um importante fator para a introdução da infecção em áreas livres, pois o agente pode permanecer viável por vários dias em uma variedade de subprodutos suínos. Portanto, a proibição do uso de subprodutos suínos para alimentação animal é imperativa no combate à enfermidade nessas regiões. A restrição à movimentação de animais em áreas de risco, medidas gerais de biossegurança nos rebanhos e redução da concentração de rebanhos em áreas críticas são altamente recomendáveis e têm surtido bons resultados.

A vacinação contra o CSFV possui uma longa história e remonta aos anos 1960, quando vacinas atenuadas altamente efetivas foram desenvolvidas e utilizadas. O uso sistemático, contínuo e maciço dessas vacinas em nível regional

e/ou nacional demonstrou eficiência em reduzir drasticamente a ocorrência da doença e a circulação do vírus ao longo dos anos. Vários países realizaram tais procedimentos e conseguiram reduzir significativamente a ocorrência e o impacto econômico-sanitário da infecção nas últimas décadas. A vacinação profilática maciça ainda é utilizada em vários países e pode representar uma etapa de transição rumo ao controle sem vacinação (acompanhado de identificação e remoção de infectados), como adotado por diversos países, incluindo o Brasil. O controle sem vacinação, no entanto, só deve ser adotado quando a incidência atingir níveis baixos e a infecção se tornar esporádica.

Em países que erradicaram o CSFV, a vacinação maciça foi banida. Nesses países, somente permite-se a vacinação de emergência no caso de surtos, embora vários países europeus que experimentaram tais eventos não tenham recorrido a essa medida. Vacinas com marcadores antigênicos seriam de valor inestimável nesses casos.

Em casos de surtos, os casos confirmados e os animais em contato devem ser sacrificados ou colocados em quarentena. A interdição da propriedade e de áreas vizinhas ao trânsito de animais, subprodutos e possíveis veículos de transmissão têm sido adotados nessas situações. A vacinação perifocal ou regional de emergência pode ser considerada, desde que permitida pela legislação sanitária do país.

Várias vacinas têm sido utilizadas ao longo dos anos no combate ao CSFV em áreas endêmicas e esporádicas. Em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a vacina atenuada (cepa chinesa) possuiu papel fundamental no controle e eventual erradicação da infecção. Nos últimos anos, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para a produção de vacinas mais efetivas e adequadas aos programas de controle e erradicação. Essas vacinas incluem vetores virais, expressando proteínas do envelope do CSFV (poxvírus, herpesvírus, adenovírus), proteínas recombinantes, vacinas de subunidade (E2, E^{ms}), peptídeos sintéticos, vacinas de DNA, entre outras. A diferenciação entre animais vacinados e infectados com o vírus de campo, assim como a possibilidade de vacinação oral de suídeos silvestres, constituem-se em metas importantes no combate à infecção.

4.2.2 Vírus da diarreia viral bovina

A doença associada com o BVDV foi inicialmente descrita por pesquisadores da Universidade de Cornell, em 1946, e se caracterizava como uma enfermidade aguda transmissível marcada por leucopenia severa, febre alta, depressão, diarreia, erosões no trato gastrointestinal e hemorragias. Cinco rebanhos foram afetados e apresentaram taxas de morbidade entre 33 e 88% e de mortalidade entre 4 e 8%. Posteriormente, outra forma da doença causada pelo BVDV foi identificada e denominada de doença das mucosas (DM). Esta forma apresentava algumas características clínico-patológicas da doença anteriormente descrita, mas se diferenciava por não ser transmitida experimentalmente e por apresentar baixa morbidade e alta mortalidade. A etiologia da DM permaneceu obscura até o reconhecimento de que apenas animais persistentemente infectados (PI) desenvolviam essa forma da doença.

Ao longo de seis décadas, uma grande variedade de manifestações clínicas foi associada com a infecção por este agente. Essas manifestações podem ser agrupadas em quatro formas principais: doença aguda leve (gastrentérica, respiratória), doença aguda severa (gastrentérica, respiratória, hemorrágica), doença das mucosas (DM), BVD crônica (recentemente reconhecida como uma forma da DM). Não obstante essa variedade de apresentações clínicas, as maiores consequências da infecção pelo BVDV parecem estar relacionadas com as perdas reprodutivas que determina.

Os isolados de campo do BVDV apresentam uma grande variabilidade antigênica, devido à presença de regiões hipervariáveis na glicoproteína E2. De acordo com as características genéticas e antigênicas, os isolados podem ser divididos em dois grupos: BVDV-1 e BVDV-2. Os vírus pertencentes ao genótipo 1 abrangem a maioria das cepas de referência e os vírus utilizados em vacinas, além de muitos isolados com virulência baixa a moderada. Os vírus pertencentes ao genótipo 2 foram inicialmente isolados de surtos de BVDV aguda e doença hemorrágica no Canadá em 1993-1994, mas incluem também isolados de virulência baixa e moderada. Os isolados do BVDV-1 e BVDV-2 já foram divididos em sub-

grupos genéticos (BVDV-1a e 1b; BVDV-2a e 2b), porém a relevância clínica e epidemiológica dessa subdivisão ainda não está esclarecida. A reatividade sorológica cruzada entre BVDV-1 e BVDV-2 é geralmente baixa, e isto apresenta implicações importantes para o diagnóstico e eficácia de vacinas.

O BVDV infecta naturalmente uma variedade de ruminantes domésticos e silvestres, além de suínos; os bovinos são considerados os seus hospedeiros naturais. *In vitro*, o BVDV é capaz de replicar em uma variedade de células de cultivo de várias espécies, inclusive de origem humana.

Com base no efeito da replicação em cultivo celular, os isolados de BVDV podem ser divididos em citopáticos (cp) e não-citopáticos (ncp). Os isolados ncp se constituem nos BVDV “verdadeiros” e são responsáveis pela maioria das infecções naturais e pelas infecções fetais persistentes. Os isolados cp se constituem em uma minoria; não são capazes de produzir infecções persistentes e são isolados quase que exclusivamente de animais com a DM. Os BVDV cp são gerados nos animais PI a partir do vírus ncp original, através de mutações, recombinações, deleções ou rearranjos genéticos que levam à expressão na proteína NS3 como um polipeptídeo individual. Em contraste, os vírus ncp expressam apenas a proteína precursora NS23. Embora o papel da NS3 na citopatologia ainda não esteja esclarecido, essa proteína é considerada o marcador molecular dos BVDV cp.

4.2.2.1 Epidemiologia

O BVDV apresenta distribuição mundial e praticamente todos os países que possuem bovinocultura significativa já relataram a sua presença. A infecção pelo BVDV já foi descrita em várias espécies silvestres, porém a relevância epidemiológica desses achados permanece incerta. Recentemente, os países escandinavos implementaram programas de erradicação. Com base no sucesso inicial desses programas, países como Alemanha, França, Estados Unidos e Rússia também iniciaram programas de erradicação do BVDV. No entanto, a erradicação do vírus desses países

é mais difícil devido à intensificação do processo produtivo e à grande população bovina e intensa movimentação de animais.

A infecção pelo BVDV tem sido descrita no Brasil desde o final dos anos 1960. Vários relatos clínico-patológicos, virológicos e sorológicos demonstram a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro. Os índices de soropositividade nos diversos estudos variam entre 18 e 84%. Vírus dos dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2) já foram identificados no país, e, aproximadamente, dois terços pertencem ao genótipo 1. O BVDV já foi isolado de diversas origens, incluindo soro fetal comercial, fetos abortados, animais PI, animais com DM, com doença respiratória, com doença gastrentérica, de rebanhos com problemas reprodutivos. Sorologia positiva em caprinos, bubalinos, javalis cativos e cervídeos silvestres também já foi relatada no país.

Os bezerros PI se constituem nos principais reservatórios e fontes de disseminação do vírus. Esses animais excretam o vírus continuamente em altos títulos em secreções (nasais, saliva, sêmen, leite) e excreções (urina, fezes – contêm pouco vírus). Durante a infecção aguda, os animais infectados também excretam o vírus, porém em títulos inferiores e por menos tempo (3 a 10 dias). O vírus é transmitido entre animais principalmente por contato direto (focinho-focinho, coito, mucosa-mucosa) e indireto (focinho-secreções/excreções, focinho-feto abortado/placenta, contato com secreções/excreções). Transmissão iatrogênica (agulhas ou material cirúrgico contaminado, luvas de palpação, tatuadores, aplicadores de brinco) e por sêmen contaminado, além de outros veículos também pode ocorrer. A transmissão vertical aos embriões/fetos é uma consequência frequente da infecção de vacas prenhes. O sêmen coletado de touros PI ou durante a infecção aguda também pode transmitir o vírus a fêmeas pela inseminação artificial.

A introdução do vírus nos rebanhos pode ocorrer por: a) introdução de animais PI; b) introdução de fêmeas gestando fetos PI; c) introdução de animais durante a infecção aguda; d) contato entre animais de rebanhos vizinhos (essa última forma parece possuir importância limitada).

4.2.2.2 Patogenia e manifestações clínicas

O epitélio do trato respiratório superior, orofaringe e o tecido linfóide regional parecem ser os sítios primários de replicação após a infecção pela via oro-nasal. As conseqüências e a severidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores que incluem a cepa viral (e o biótipo), o *status* imunológico do animal, o *status* reprodutivo e a ocorrência de infecções secundárias. Embora o primeiro relato de BVD tenha sido de uma forma aguda severa, os casos posteriormente relatados demonstraram que a maioria das infecções agudas de animais imuno-competentes cursava sem manifestações clínicas aparentes ou com sinais discretos. De acordo com as conseqüências clínico-patológicas e epidemiológicas, pode-se dividir a infecção pelo BVDV em duas categorias principais: infecção aguda de animais não-prenhes e infecção aguda de fêmeas prenhes.

Infecção aguda de animais não-prenhes

A maioria das infecções de animais imuno-competentes é assintomática, mas pode cursar com quadros febris leves, muitas vezes imperceptíveis. Alguns isolados de maior virulência podem provocar um período febril curto, acompanhado por sialorréia, hiperemia e descarga nasal, tosse e diarreia. O período de incubação varia entre 3 e 7 dias e é seguido de hipertermia transitória e leucopenia. O vírus pode ser detectado no sangue entre 4 e 6 dias após a infecção e pode persistir por até 15 dias. Sinais de infecção respiratória também podem ser observados. Lesões ulcerativas na mucosa oral podem estar presentes. Nos casos de infecção aguda com comprometimento respiratório e/ou digestivo, antígenos virais podem ser detectados por imunistoquímica (IHC) nas tonsilas, linfonodos regionais, pulmões e epitélio intestinal. O tecido linfóide (tonsilas, linfonodos, tecido linfóide associado a mucosas, placas de Peyer) se constitui em importante sítio de replicação viral. A enfermidade geralmente é autolimitante, cursando com morbidade alta

e mortalidade muito baixa ou nula. No entanto, mortalidade considerável pode, ocasionalmente, ocorrer em animais jovens, principalmente associada com o BVDV-2. A enfermidade pode acometer todas as categorias de animais, principalmente bezerros maiores de seis meses.

O BVDV é também imunossupressor, podendo predispor os animais infectados a infecções com outros agentes patogênicos. Assim, casos de enfermidade entérica ou respiratória por outros patógenos virais (herpesvírus bovino tipo 1 [BoHV-1]; vírus respiratório sincicial bovino [BRSV] e vírus da parainfluenza tipo 3 [bPI3v]) e bacterianos podem ser potencializados durante a infecção aguda pelo BVDV. Enfermidade respiratória crônica, associada com diferentes bactérias, e quadros persistentes de dermatite também têm sido associados com a infecção pelo BVDV em bezerros confinados.

Até o final dos anos 1980, a importância maior do BVDV era atribuída às conseqüências da infecção transplacentária: perdas reprodutivas, produção de animais PI e DM. No entanto, no final dos anos 1980, casos severos de BVDV aguda se tornaram mais freqüentes. Casos descritos entre os anos de 1977 e 1987 revelaram que 10% dos casos de infecção clínica aguda pelo BVD em animais adultos apresentavam trombocitopenia. Um surto, em um rebanho leiteiro no estado de Nova Iorque, resultou em 50% de morbidade e 20% de mortalidade. Esses animais apresentavam febre, diarreia sanguinolenta, hemorragias e tempo de coagulação retardado. Esta forma de apresentação da infecção pelo BVDV foi posteriormente caracterizada como uma forma distinta de BVD, denominada de BVD aguda hemorrágica (síndrome hemorrágica).

Surtos importantes dessa enfermidade foram descritos no Canadá entre 1993 e 1994, resultando na morte de aproximadamente 32 mil animais (taxa de mortalidade de 22,4% entre bezerros). Em torno de 150 rebanhos de leite, 660 de corte e 100 de vitelos foram afetados; e animais de diferentes faixas etárias foram afetados e morreram. As lesões encontradas eram similares às observadas na DM. No entanto, dois importantes pontos diferenciam a infecção aguda hemorrágica pelo BVDV da DM: a presença de vírus citopático

e as taxas de morbidade e mortalidade. Enquanto a patogenia da DM exige necessariamente a presença de vírus dos dois biótipos (cp e ncp), a forma severa de BVD aguda apresenta apenas um biótipo do vírus, geralmente ncp. Além disso, as taxas de mortalidade na DM são de 100%, e a taxa de morbidade é baixa (correspondente ao número de animais PI em um rebanho). Na forma severa de BVD aguda, as taxas de mortalidade são baixas, porém a taxa de morbidade é alta. Geralmente, entre 50 a 90% dos animais clinicamente infectados se recuperam.

Os surtos de infecção aguda pelo BVDV estão diretamente relacionados com a virulência da cepa envolvida. A disseminação de cepas de baixa virulência na população ocorre como resultado do contato direto com animais PI, o que limita a disseminação desses vírus. Já a disseminação de vírus de alta virulência ocorre de forma semelhante ao CSFV, ou seja, a partir de animais com a infecção aguda.

Infecção aguda de fêmeas prenhes

A infecção de fêmeas prenhes soronegativas é frequentemente seguida de transmissão transplacentária do vírus ao embrião ou feto. As consequências da infecção do conceito dependem do estágio de gestação em que ocorre a infecção, do biótipo (cp/ncp) e da cepa do vírus. Podem ocorrer reabsorção embrionária (com retorno ao cio em intervalos regulares ou irregulares), abortos, mumificação fetal, natimortos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, que morrem em seguida ou apresentam crescimento retardado; ou o nascimento de animais PI. Em geral, abortos em qualquer fase de gestação podem ser atribuídos ao BVDV. Fetos infectados no terço final da gestação frequentemente nascem normais, livres do vírus e soropositivos. As possíveis consequências da infecção pelo BVDV estão ilustradas na Figura 22.6.

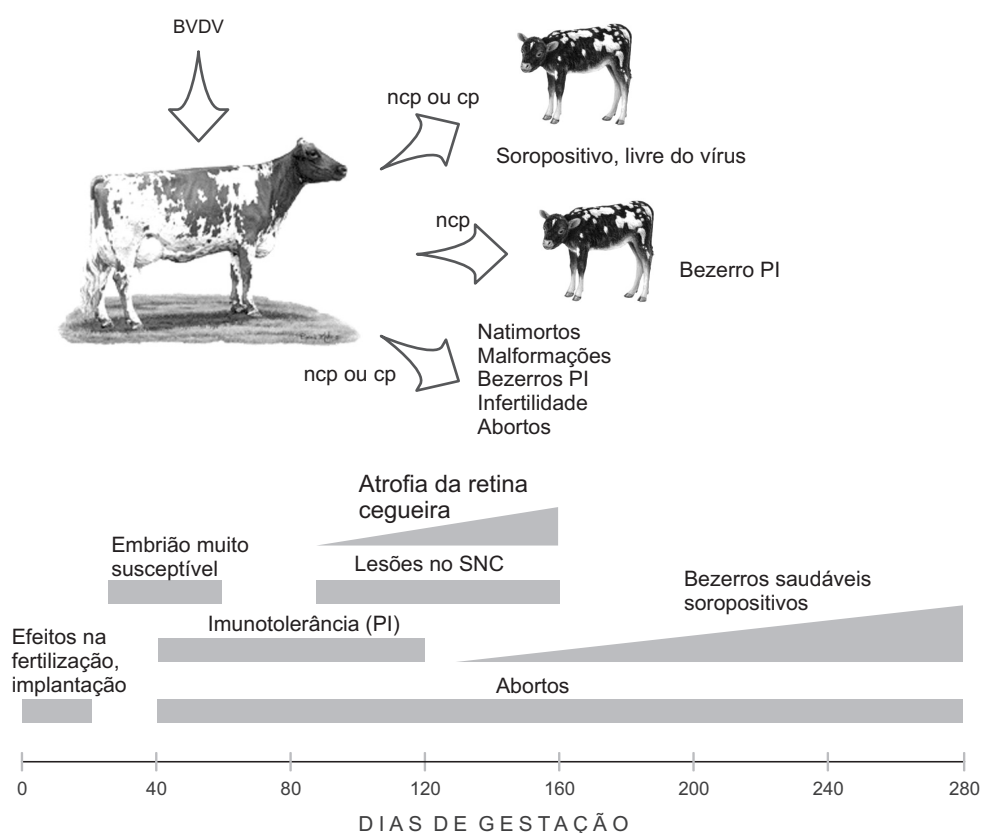


Figura 22.6. Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes pelo BVDV, de acordo com o biótipo do vírus e com o estágio de gestação.

A ocorrência de malformações fetais é um achado muito comum em rebanhos infectados e geralmente acontece quando a infecção ocorre entre os 100 e 150 dias de gestação. As malformações principais podem ser encontradas no sistema nervoso central (hipoplasia cerebelar, microcefalia, hidrocefalia, mielinização deficiente na medula espinhal) e nos olhos (atrofia ou displasia da retina, catarata, microftalmia), podendo observar-se, ainda, aplasia tímica, braquignatismo, retardo de crescimento e artrogripose. Em muitos rebanhos, as malformações são os primeiros e, algumas vezes, os únicos achados que indicam a presença do vírus.

Infecção persistente

O estabelecimento da infecção persistente ocorre quando o feto é infectado entre os 40 e 120 dias de gestação (Figura 22.6). Os fetos infectados nesse período desenvolvem imunotolerância ao vírus infectante e o seu organismo jamais consegue erradicar o vírus. Esses animais tornam-se portadores permanentes e excretam o vírus continuamente em secreções e excreções. Os bezerros que nascem PI são geralmente soronegativos. Os fetos que são infectados após o 125º dia de gestação são considerados imunocompetentes e podem desenvolver uma resposta imunológica que, freqüentemente, resulta na erradicação do agente. Os fetos congenitamente infectados podem apresentar alguns defeitos em decorrência da infecção transplacentária ou podem nascer aparentemente normais. Os animais PI podem apresentar crescimento retardado, malformações congênitas ou ser aparentemente saudáveis. Alguns apresentam crescimento retardado e são mais susceptíveis a infecções secundárias. Como descrito anteriormente, apenas cepas de BVDV não-citopáticas podem estabelecer infecções persistentes. Animais persistentemente infectados com o BVDV representam o maior reservatório do vírus na natureza e, por isso, são considerados mantenedores do vírus na natureza. A maioria dos animais PI morre nos primeiros meses de vida, no entanto, alguns deles podem viver até os dois anos ou mais. Existem vários relatos

de animais PI que sobrevivem até a idade adulta, podendo se tornar reprodutores e transmitir o vírus para a progênie (fêmeas) ou pelo sêmen (machos). Fêmeas PI que atingem a idade adulta e ficam prenhes geralmente produzem bezerros PI.

Etiopatogenia da doença das mucosas

A doença das mucosas (DM) é uma enfermidade gastrentérica fatal, desencadeada quando um animal PI (portador de um BVDVncp) é superinfectado com um BVDV citopático (BVDVcp) antigenicamente semelhante. O BVDVcp que determina o desenvolvimento da DM geralmente se origina do BVDVncp do próprio animal PI por mutações. Vários tipos de mutações, deleções e rearranjos genéticos têm sido identificados na geração de BVDVcp, todos esses mecanismos resultam na expressão da proteína viral NS3. Outras fontes de vírus citopáticos que podem determinar a DM incluem vírus de vacinas vivas modificadas ou transmissão de vírus cp a partir de outros animais PI. Nos animais que desenvolvem a DM, os dois vírus (ncp e cp) estão presentes (Figura 22.7).

A DM é invariavelmente fatal, ocorre principalmente em animais com seis meses a dois anos de idade e se caracteriza por febre, leucopenia, diarreia, inapetência, desidratação, lesões erosivas nas narinas e na boca e morte dentro de poucos dias. Na necropsia, erosões e ulcerações podem ser encontradas no trato gastrointestinal, particularmente nas placas de Peyer. No esôfago, essas lesões apresentam-se no sentido longitudinal, com aspecto de “arranhão de gato”. As placas de Peyer apresentam-se edematosas, hemorrágicas e necróticas. O conteúdo intestinal é escuro e aquoso e observa-se enterite catarral ou hemorrágica. A histopatologia revela uma necrose extensiva dos tecidos linfóides, incluindo as placas de Peyer, nos centros germinativos do baço e linfonodos. Devido à proporção de animais PI em um rebanho ser geralmente muito baixa, a morbidade da DM também é baixa. A letalidade é próxima de 100%.

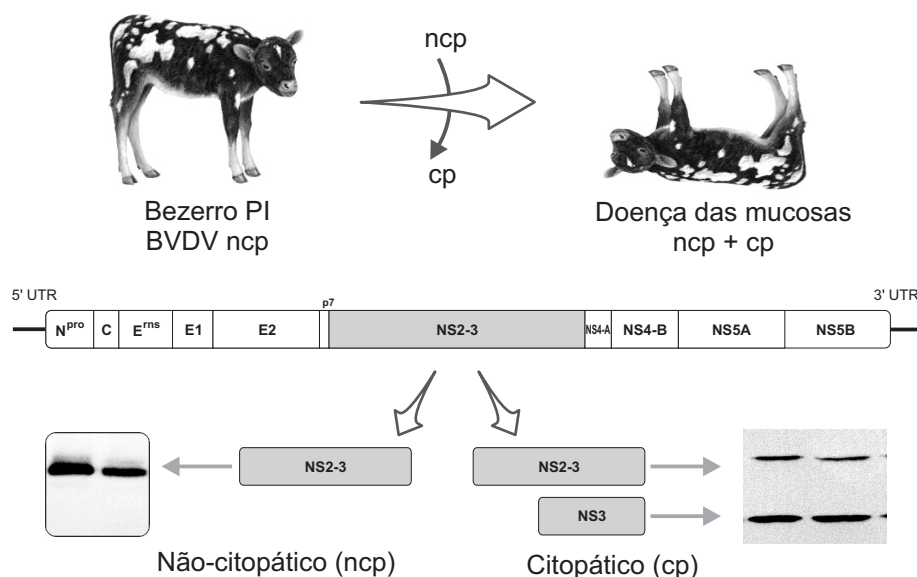


Figura 22.7. Etiopatogenia da doença das mucosas (DM). Em bezerros nascidos imunotolerantes e persistentemente infectados com um BVDV ncp, mutantes cp podem ser gerados a partir de mutações do vírus original. A replicação do par de vírus (ncp/cp) leva ao desenvolvimento da enfermidade, que apresenta curso fatal. A principal diferença molecular entre os vírus ncp e cp é a expressão da proteína NS3 pelo vírus cp, enquanto o ncp expressa apenas o precursor NS23.

Na DM crônica, menos comum, os sinais clínicos são inespecíficos. Observa-se inapetência, perda de peso e apatia progressiva. A diarreia pode ser contínua ou intermitente. Algumas vezes, ocorrem descarga nasal e descarga ocular persistente. Áreas alopecias e de hiperqueratinização podem aparecer, geralmente no pescoço. Lesões erosivas crônicas podem ser observadas na mucosa oral e na pele. Laminite, necrose interdital e deformação do casco podem também ocorrer. Esses animais podem sobreviver por muitos meses e, geralmente, morrem após debilitação progressiva.

4.2.2.3 Diagnóstico

Deve-se suspeitar de infecção pelo BVDV sempre que houver uma ocorrência de perdas embrionárias, abortos, malformações fetais, nascimento de animais fracos ou morte perinatal. Além disso, casos de doença entérica e/ou respiratória com componentes hemorrágicos (melena, petéquias em mucosas, serosas etc.), erosões e ulcerações no trato digestivo também são sugestivos dessa infecção. Essas manifestações ocorrem principalmente, mas não exclusivamente, em

animais jovens. Bezerros fracos, com crescimento retardado e predisposição a outras enfermidades devem ser considerados potencialmente suspeitos de serem PI.

O teste padrão de diagnóstico é o isolamento do agente em cultivos celulares seguido por identificação por IFA ou IPX, pois a maioria das amostras é não-citopática. Células de origem bovina, particularmente as primárias, são muito susceptíveis ao vírus. O sangue (especialmente os leucócitos) de animais infectados de forma aguda ou persistente é muito rico em vírus. Em geral, os títulos de vírus no sangue de animais PI são muito maiores do que em animais com a infecção aguda.

Além do isolamento, antígenos virais podem ser demonstrados em tecidos (fetos abortados, placentomas, fragmentos de tecidos coletados na necropsia) por IF e IPX. Um teste de ELISA de captura de antígeno, destinado a detectar proteínas virais no soro de animais PI, apresenta boa especificidade e sensibilidade e pode ser realizado para testar um grande número de amostras. Biópsias de pele (fragmentos de orelha) para a detecção de antígenos virais por IPX ou ELISA têm sido popularizadas na América do Norte para a

triagem e detecção de animais PI. Isolamento do vírus ou detecção de RNA viral por PCR no leite tem sido utilizado para identificar rebanhos leiteiros infectados.

O diagnóstico sorológico geralmente é realizado pela técnica de SN ou ELISA. A identificação de soropositividade de um animal indica apenas exposição prévia ao agente. Animais infectados de forma aguda, soroconvertem 10-14 dias após a infecção inicial. Nestes animais, a sorologia pareada pode indicar a infecção. Animais PI geralmente não apresentam anticorpos no soro, já que não são capazes de responder imunologicamente ao vírus. Exames sorológicos de rebanhos, devido à prática de vacinação, têm valor epidemiológico limitado e servem unicamente para verificar o *status* sorológico e a possível circulação do vírus no rebanho.

Em termos de controle ou erradicação, o diagnóstico de BVDV deve ser focado na detecção dos animais PI. O isolamento viral e/ou detecção de antígenos no plasma e/ou em biópsias de orelha por ELISA/IPX são os métodos de eleição.

4.2.2.4 Controle e profilaxia

O controle da infecção pelo BVD pode ser efetuado com ou sem o uso de vacinas, dependendo do histórico do rebanho, do risco de introdução do agente e de outros fatores epidemiológicos. O *controle com vacinação* é indicado para rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica ou reprodutiva, e com confirmação virológica de BVDV. Também é indicado para propriedades de terminação de novilhos, nas quais animais de várias procedências são agrupados e mantidos em alta densidade por área. Rebanhos leiteiros, com introdução freqüente de animais e troca de reprodutores, também podem ser aconselhados a realizar a vacinação. Rebanhos que comercializam reprodutores, mesmo que sejam negativos, podem vacinar os animais destinados à venda, o que protege de eventual infecção nos rebanhos de destino.

Nos Estados Unidos, existem dezenas de vacinas contra o BVDV, mono e polivalentes, ate-

nuadas e inativadas. No Brasil, todas as vacinas para o BVDV disponíveis atualmente são inativadas, contendo adjuvante oleoso ou hidróxido de alumínio. Essas vacinas possuem também antígenos de outros agentes infecciosos como o BoHV-1, bPI3v e BRSV e algumas contêm pasteurelas. A vacinação deve seguir o esquema indicado pelos fabricantes. Geralmente, os bezerros são vacinados aos 4 a 6 meses de idade e revacinados de 30 a 40 dias após. Alguns animais podem, ainda, possuir anticorpos maternos nessa idade. Assim, é recomendada uma revacinação aos 8 ou 12 meses. Revacinações a cada 6 a 12 meses devem ser realizadas para manutenção da imunidade. No caso das fêmeas, recomenda-se revacinação previamente à temporada de monta (2 a 3 semanas antes da cobertura). Vacinas com vírus atenuado são disponíveis nos EUA e em outros países e apresentam maior eficácia, porém oferecem o risco de infecção fetal. As vacinas contra o BVDV, se corretamente utilizadas, podem conferir proteção razoável contra a doença clínica, porém são geralmente pouco eficientes para induzir proteção fetal.

Vacinas produzidas com cepas de BVDV-1 em geral induzem proteção parcial ou incompleta contra cepas de BVDV-2. No Brasil, a maioria das vacinas contém apenas vírus do genótipo 1, porém algumas vacinas recentemente importadas e outras em vias de produção incluem também vírus do genótipo 2. A tendência é que as vacinas futuras contra o BVDV contenham os dois genótipos, além de representantes dos subgenótipos.

O *controle sem vacinação* é indicado para rebanhos fechados, sem o ingresso freqüente de animais e, conseqüentemente, de baixo risco. Rebanhos extensivos de gado de corte geralmente se enquadram nessa categoria. Esse tipo de controle é também indicado para rebanhos cujos parâmetros reprodutivos e clínicos não registrem eventos sugestivos da infecção pelo BVDV. Rebanhos com sorologia negativa e cujo ingresso de animais seja raro ou eventual também não apresentam grande risco de introdução do agente. Nesses casos, pode-se utilizar o controle sem vacinação, que objetiva manter o *status* negativo do rebanho. Para evitar a introdução da infecção,

deve-se recorrer a medidas básicas de biossegurança e testar, para vírus, todos os animais antes de ingressarem na propriedade. Com essa medida, é possível manter rebanhos livres da infecção, pois a principal forma de introdução da infecção é por meio de animais infectados (na fase aguda ou persistente). Bezerros (potencialmente PI) e vacas prenhes soropositivas (potencialmente carreando fetos PI) devem ser especialmente considerados, pois representam potenciais formas de introdução do vírus nos rebanhos. Em rebanhos suspeitos de possuir animais PI ou com histórico de casos clínicos suspeitos de BVDV, o controle deve enfatizar a identificação e remoção desses animais.

Nos países escandinavos, o programa de erradicação tem por principal objetivo a identificação e a remoção dos animais PI. Nesses países, a vacinação não foi utilizada como parte do programa de erradicação devido ao fato de que, com a vacinação, se perde o indicador sorológico da presença da infecção no rebanho. A incidência do BVDV era relativamente baixa, o que encorajou a implementação do programa de erradicação sem a utilização da vacinação. Além disso, a importação de animais, o transporte e a densidade eram relativamente baixos quando comparadas com outros países. Em países em que a prevalência do BVDV é próxima ou acima de 50%, associada com grande movimentação e importação de animais, programas de controle e erradicação provavelmente devem utilizar a vacinação do rebanho além da identificação e eliminação dos animais PI.

4.2.3 Vírus da doença da fronteira

A doença da fronteira (*border disease*, BD) é uma doença reprodutiva de ovinos causada por um pestivírus denominado BDV. Além dos ovinos, o BDV pode infectar naturalmente caprinos, bovinos e suínos. A infecção de ovelhas não prenhes é geralmente subclínica, mas pode cursar com febre leve e leucopenia transitória. Em ove-

lhas prenhes, o vírus é capaz de atravessar a barreira transplacentária e infectar o feto, resultando em abortamentos, nascimento de cordeiros fracos e inviáveis, além de malformações congênitas.

Em animais que nascem a termo, as consequências da infecção dependem da fase de gestação em que ocorreu a infecção. Quando a infecção ocorrer após os 80 dias de gestação, pode ocorrer o nascimento de cordeiros com cobertura escassa e anormal de lã, geralmente pequenos, fracos e com graus variáveis de tremor. Outros cordeiros infectados pelo BDV podem apresentar anormalidades esqueléticas, como uma desproporcionalidade dos membros anteriores, cabeças pequenas e ossos finos.

Similarmente ao BVDV em bovinos, os cordeiros podem nascer persistentemente infectados com o BDV e excretar o vírus continuamente. No entanto, sabe-se que cordeiros que nascem PI do BDV apresentam uma viabilidade reduzida quando comparados aos bezerros PI do BVDV. A sua importância da epidemiologia da infecção é incerta, mas provavelmente é menor do que no BVDV, devido à sua baixa viabilidade e pouco tempo de vida.

O diagnóstico da infecção pelo BDV pode ser realizado por isolamento viral ou por imunistoquímica nos tecidos. Existem poucas vacinas e kits de diagnóstico para o BDV disponíveis no mercado mundial.

4.3 Gênero *Hepacivirus*

Até o momento só existe uma espécie reconhecida dentro deste gênero (Tabela 22.4). No entanto, existem seis grupos genéticos – chamados de clãs. As diferenças genéticas entre os clãs são significativas (25 a 35% em nível de nucleotídeos). Esses clãs não são considerados espécies diferentes até o presente, pois características de diferenciação taxonômica, como sorotipos ou diferenças nos hospedeiros, que justificassem essa classificação ainda não foram identificadas.

Tabela 22.4. Espécies virais do gênero *Hepacivirus*.

Espécies reconhecidas	
Vírus da hepatite C (HCV) <i>hepatitis C virus</i>	Grupos genéticos dentro das espécies
	HCV clade 1
	HCV clade 2
	HCV clade 3
	HCV clade 4
	HCV clade 5
	HCV clade 6
Espécies provisórias	
GB virus B	

5 Bibliografia consultada

- BAKER, J.C. Clinical aspects of bovine virus diarrhea infection. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, p.25-41, 1990.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.425-445, 1995.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.425-445, 1995.
- BEAUDEAU, F. et al. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. **Veterinary Microbiology**, v.80, p.329-337, 2001.
- BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H.J. RNA Recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. **Journal of Virology**, v.75, p.6256-6264, 2001.
- BOLIN, S. Control of bovine viral diarrhea virus infection by use of vaccination. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.615-626, 1995.
- BOLIN, S.; LITTLEDIKE, E.T.; RIDPATH, J.F. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea virus in a vaccinated herd. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.1033-1047, 1991.
- BOLIN, S.R. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.615-623, 1995.
- BOLIN, S.R. The pathogenesis of mucosal disease. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.489-500, 1995.
- BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccine. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p.703-707, 1990.
- BROWNLIE, J. et al. Protection of bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. **The Veterinary Record**, v.137, p.58-62, 1995.
- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhea virus infection. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, p.43-59, 1990.
- COLIJN, E.O.; BLOEMRAAD, M.; WENSVOORT, G. An improved ELISA for the detection of serum antibodies direct against classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, v.59, p.15-25, 1997.
- COLLETT, M.S. et al. Bovine viral diarrhea virus genomic organization. **Archives of Virology. Supplementum**, v.3, p.19-27, 1991.
- COLLETT, M.S. Molecular genetics of pestivirus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, p.145-154, 1992.
- COLLETT, M.S.; MOENING V.; HORZINEK, M.C. Recent advances in pestivirus research. **The Journal General Virology**, v.70, p.253-266, 1989.
- CONDIT, R.C. Principles of Virology. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.2, p.19-51.
- CORAPI, W.V.; DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p.1388-1394, 1990.
- DE MOERLOOZE, L. et al. The coding region for the 54-kDa protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "Zinc finger-like" domain. **Virology**, v.177, p. 812-815, 1990.
- DINTER, Z.; MOREIN, B. (Eds). **Virus Infections of Ruminants**. New York, NY: Elsevier, 1990.
- DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.393-423, 1995.
- DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.393-423, 1995.
- FAUQUET, C.M. et al. (Eds). **Virus taxonomy**, VIIIth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. 2.ed. San Diego, CA: Elsevier, 2005. 1162p.
- FLORES, E.F. et al. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in Brazil: history, current situation and perspectives. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.3, p.125-134, 2005.

- FLORES, E.F. et al. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.4, p.55, 1999.
- FLORES, E.F. et al. Phylogenetics analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v.87, p.51-60, 2002.
- FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection due to a block in viral entry. **Virology**, v.208, p.565-575, 1995.
- FLORES, E.F.; KREUTZ, L.C.; DONIS, R.O. Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. **The Journal of General Virology**, v.77, p.1295-1303, 1996.
- FRANCKI, R.I.B. et al. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on the taxonomy of viruses. **Archives of Virology. Supplementum**, v.2, p.223-233, 1991.
- FULTON, R.W.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v.19, p.264-274, 2001.
- GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A., McENTEE, K. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. **The Cornell Veterinarian**, v.50, p.73-79, 1960.
- GREISER-WILKE, I. et al. Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. **The Journal General Virology**, v.73, p.47-52, 1992.
- HORZINEK, M.C. **Non-artropod-borne togaviruses**. New York: Academic Press, 1981. 200p.
- HORZINEK, M.C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Archives of Virology. Supplementum**, v.3, p.1-5, 1991.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.521-547, 1995.
- HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; BROWNLIE, J. Comparisons by neutralization assays of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v.13, p.361-369, 1987.
- KIRKLAND, P.D. et al. The impact of pestivirus on an artificial breeding program for cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.67, p.261-263, 1990.
- KÜMMERER, B.M. et al. The genetic basis for cytopathogenicity of pestivirus. **Veterinary Microbiology**, v.77, p.117-128, 2000.
- KUNO, G. et al. Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v.72, p.73-83, 1998.
- MEYERS, G.; THIEL, H.J. Molecular characterization of pestiviruses. **Advances in Virus Research**, v.47, p.53-118, 1996.
- OLAFSON, P. et al. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v.36, p.205-213, 1946.
- PENSAERT, M.B. (Ed). **Virus infections of porcines**. New York, NY: Elsevier, 1989.
- POTGIETER, L.N. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p.501-520, 1995.
- QI, F.; RIDPATH, J.F.; BERRY, E.S. Insertion of a bovine SMT3B gene in NS4B and duplication of NS3 in a bovine viral diarrhoea virus genome correlate with the cytopathogenicity of the virus. **Virus Research**, v.57, p.1-9, 1998.
- RIDPATH, J.F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v.31, p.127-131, 2003.
- RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.; DUBOVI, E. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v.205, p.66-74, 1994.
- RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D. Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea viruses. **Journal of Virology**, v.74, p.8771-8774, 2000.
- SPICKLER, A.R.; ROTH, J.A. (Eds). **Emerging and Exotic Disease of Animals**. 2.ed. Ames, IA: Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University College of Veterinary Medicine, 2004.
- STUDDERT, M.J. (Ed). **Virus Infections of Equines**. New York, NY: Elsevier Science Publishers, 1996.
- TAUTZ, N.; MEYERS, G.; THIEL, H.J. Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. **Virology**, v.197, p.74-85, 1993.
- TAUTZ, N.; THIEL, H.J. Cytopathogenicity of pestivirus: cleavage of bovine viral diarrhoea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication. **Archives of Virology**, v.148, p. 1405-1412, 2003.
- VAN DER MEULEN, K.M.; PENSAERT, M.B.; NAUWYNCK, H.J. West Nile in the Vertebrate World. **Archives of Virology**, v.150, p.637-657, 2005.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; BRUSCHKE, C.J.M.; VAN RIJN, P.A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.169-183, 1999.
- WHITMORE, H.L.; ZEMJANIS, R.; OLSON, J. Effects of bovine viral diarrhoea virus on conception in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.178, p.1065-1067, 1981.

1 Introdução	595
2 Classificação	595
3 Estrutura do vírion e do genoma	597
4 Replicação	598
4.1 O ciclo replicativo	598
5 Epidemiologia	601
6 As encefalites eqüinas (ou encefalomiélites eqüinas)	602
6.1 Encefalite eqüina venezuelana	602
6.1.1 O agente	603
6.1.2 Epidemiologia	603
6.1.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia	606
6.1.4 Imunidade	607
6.1.5 Diagnóstico	608
6.1.6 Controle e profilaxia	608
6.2 Encefalite eqüina do leste	609
6.2.1 Epidemiologia	609
6.2.2 Patogenia e sinais clínicos	610
6.2.3 Diagnóstico	610
6.2.4 Controle e profilaxia	610
6.3 Encefalite eqüina do oeste	610
6.3.1 Epidemiologia	611
6.3.2 Patogenia e sinais clínicos	611
6.3.3 Diagnóstico	611
6.3.4 Controle e profilaxia	611
7 Bibliografia consultada	611

1 Introdução

A família *Togaviridae* abrange um grupo de vírus envelopados que possuem uma molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva como genoma. A denominação *Toga* deriva da aparência frouxa do envelope viral – lembrando a vestimenta romana –, observada nas primeiras imagens dos vírions obtidas por microscopia eletrônica. No entanto, estudos posteriores demonstraram que o envelope desses vírus encontra-se intimamente associado ao nucleocapsídeo. Esta família é composta por dois gêneros: *Alfavirus* e *Rubivirus*. O gênero *Alfavirus* abriga vários patógenos humanos e animais, cuja principal característica em comum é a transmissão por vetores artrópodes. O gênero *Rubivirus* abriga apenas o vírus da rubéola, um patógeno exclusivo de humanos e que não é transmitido por insetos. Classicamente, a *Togaviridae* era uma família maior e incluía os flavivírus, pestivírus e outros vírus até então pouco caracterizados. Diferenças moleculares levaram os flavivírus (e os pestivírus) a serem reclassificados na família *Flaviviridae*.

Os alfavírus são considerados arbovírus (*arthropod borne virus*) clássicos, juntamente com os flavivírus e os bunivírus. Dentre os alfavírus de interesse veterinário, destacam-se os vírus das encefalites eqüinas do leste (EEEV), oeste (WEEV) e venezuelana (VEEV), além de outros arbovírus de encefalites de importância regional em vários países. O protótipo da família é o vírus *Sindbis* (SIN), isolado inicialmente de mosquitos no Egito e, ocasionalmente, associado com infecções em humanos. Apesar da sua importância clínica limitada, contribuições inestimáveis sobre a arquitetura da partícula viral, estrutura e função das glicoproteínas do envelope e regulação da expressão gênica foram obtidas com estudos do SIN de outro alfavírus, o vírus *Semliki Forest* (SFV). Nos últimos anos, o SIN também tem sido testado como vetor para terapia gênica e vacinas.

Os alfavírus podem infectar naturalmente várias espécies de aves, pequenos mamíferos e insetos, sendo mantidos na natureza graças a ciclos alternados nessas espécies. A distribuição geográfica de cada espécie de alfavírus é geral-

mente limitada, e é determinada pela existência de condições ecológico-ambientais para a sobrevivência e atividade dos vetores. Para a maioria dos alfavírus, as infecções de animais domésticos e humanos constituem-se em eventos acidentais e possuem, portanto, importância epidemiológica limitada. Para poucos alfavírus, os ciclos de replicação em espécies domésticas (eqüinos e aves) podem contribuir para a sua amplificação e desencadeamento de epizootias/epidemias.

Além da estrutura e epidemiologia similar, os alfavírus são antigenicamente relacionados entre si e apresentam várias propriedades genéticas, moleculares e biológicas semelhantes.

Este capítulo aborda inicialmente as características gerais da família *Togaviridae* e a, seguir, as viroses associadas com os alfavírus de importância veterinária.

2 Classificação

A família *Togaviridae* é composta por dois gêneros: *Alfavirus* e *Rubivirus*. O gênero *Alfavirus* abrange aproximadamente 30 espécies de vírus, alguns dos quais têm sido associados com doença em animais domésticos (eqüinos e aves), silvestres (aves e mamíferos) e ocasionalmente humanos. Esses vírus possuem características estruturais e morfológicas em comum, são transmitidos por insetos e apresentam uma considerável relação antigênica. Grande parte da reatividade antigênica cruzada deve-se à similaridade da proteína do capsídeo. De acordo com o grau de similaridade antigênica, os alfavírus podem ser distribuídos nos seguintes grupos: o WEEV apresenta vários sorotipos, e o seu grupo inclui ainda o vírus *Highlands J* e o SIN; o VEEV possui sete sorotipos (I a VII), e alguns variantes dentro do sorotipo I (AB, C, D, E e F); o EEEV possui dois variantes antigênicos (sul e norte-americano); o grupo antigênico do SFV inclui ainda os vírus *Mayaro*, *Getah*, *Ross River*, *O'Nyong-Nyong* e *Chikungunya*. A reatividade sorológica cruzada é observada apenas entre vírus do mesmo grupo e não entre os gêneros. Apesar de sua relação antigênica, os membros do gênero *Alfavirus* apresentam diferenças antigênicas e moleculares, que podem ser detectadas por testes sorológicos e por análise de seqüências genômicas.

Pouco se sabe sobre possíveis diferenças e semelhanças no ciclo replicativo da maioria dos alfavírus, embora seja evidente que cada membro do gênero apresenta um potencial patogênico distinto. Grande parte dos conhecimentos sobre a estrutura e replicação desses vírus foi obtida a partir de estudos com os vírus protótipos SIN e SFV.

O gênero *Rubivirus* possui apenas o vírus da rubéola, que não apresenta relação antigênica com os alfavírus. No entanto, algumas propriedades estruturais e biológicas indicam que esses dois gêneros evoluíram de um mesmo ancestral. Os humanos são os únicos hospedeiros conheci-

dos dos rubivírus, e a sua transmissão não envolve a participação de insetos.

Na Tabela 23.1, estão relacionados os principais alfavírus associados com enfermidades em animais e humanos.

O potencial zoonótico dos alfavírus tem sido relatado principalmente para o EEEV, WEEV e VEEV. Também tem sido relatada doença febril, acompanhada de eritema e artrite em humanos, associada com os alfavírus Ross River (Austrália, Oceano Pacífico), SFV (África), Mayaro (Trinidad e Tobago, América do Sul) e vírus do grupo do Sindbis (África, Ásia e Austrália).

Tabela 23.1. Principais alfavírus de interesse médico e veterinário.

Vírus	Hospedeiros naturais	Espécies afetadas	Enfermidade	Vetores	Distribuição
Encefalite eqüina do leste (EEEV)	Aves silvestres de áreas pantanosas	Eqüinos, aves domésticas (faisões, galinha, emas, patos)	Doença febril, encefalite	Mosquitos (<i>Culiseta melanura</i> , <i>Aedes sollicitans</i> , <i>A. vexans</i>)	EUA (costa leste e do Golfo do México), América Central e Caribe, costa norte da América do Sul
Encefalite eqüina do oeste (WEEV)	Aves silvestres, pequenos mamíferos	Eqüinos	Encefalite, doença febril	Mosquitos (<i>Culex tarsalis</i>)	Planícies centrais e ocidentais dos EUA e Canadá
Encefalite eqüina venezuelana (VEEV)	Roedores silvestres, eqüinos (vírus epizooticos)	Eqüídeos (eqüinos, asininos, burros)	Encefalite, doença febril	Mosquitos (<i>Culex sp</i>)	América Central, norte/noroeste da América do Sul
Getah	Pássaros, mamíferos	Eqüinos	Doença febril	Mosquitos	Sudeste Asiático
Higlands J	Pássaros, mamíferos (?)	Eqüinos	Doença febril, encefalite	Mosquitos	Américas
Chikungunya (CHIK)	Primatas	Primatas, humanos	Doença febril, exantema, artralgias	Mosquitos	África, Índia, Sudeste Asiático
Mayaro (May)	Primatas	Primatas, humanos	Doença febril, exantema, artralgias	Mosquitos	América do Sul, Trinidad e Tobago
O'nyong-nyong (ONN)	Primatas	Humanos	Doença febril, exantema, artralgias	Mosquitos	África
Ross River (RR)	Mamíferos silvestres	Mamíferos, humanos	Doença febril, exantema, artralgias	Mosquitos	Austrália, Ilhas do Pacífico
Sindbis (SIN)	Pássaros	Pássaros, humanos	Doença febril, exantema, artralgias	Mosquitos	Norte da Europa, África, Ásia e Austrália
Semliki Forest (SFV)	Pássaros	Pássaros, humanos, eqüinos	Doença febril, rara encefalite	Mosquitos	África

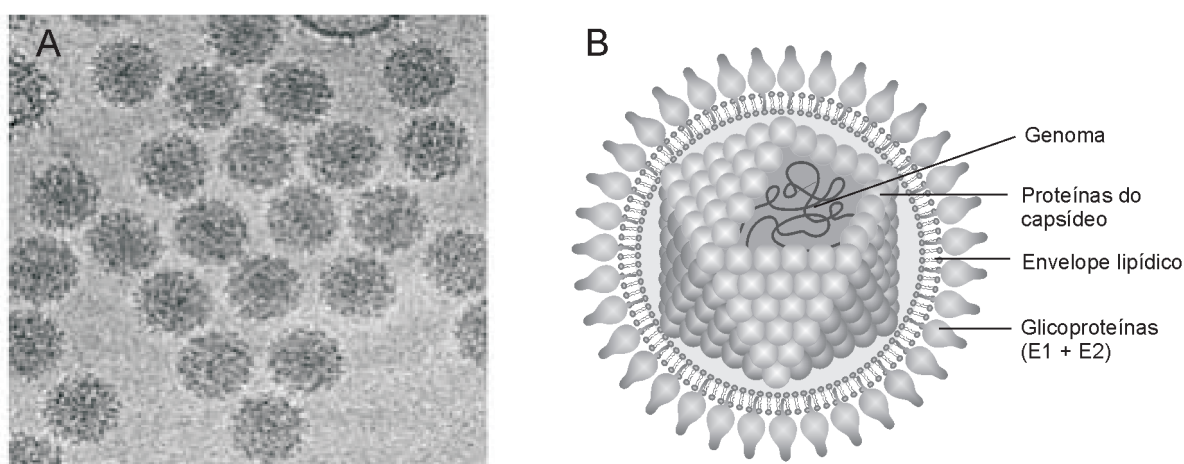
3 Estrutura do vírion e do genoma

Os vírions da família *Togaviridae* estão entre os vírus envelopados mais simples. Os vírions são esféricos ou levemente pleomórficos, com diâmetro aproximado de 70 nm (Figura 23.1), com um nucleocapsídeo isométrico, com aproximadamente 40 nm de diâmetro, formado por 240 cópias da proteína do capsídeo (C), arranjadas em simetria icosaédrica. O nucleocapsídeo é revestido externamente por um envelope lipídico, intimamente associado, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira. O envelope apresenta 80 projeções externas (peplômeros), cada uma formada pela associação de três heterodímeros das glicoproteínas E1 e E2. Uma das extremidades da E2 projeta-se internamente e interage com o nucleocapsídeo. As três proteínas estruturais principais apresentam massas de 30-33 kDa (C), ~50 kDa (E1) e ~45 kDa (E2). Uma terceira glicoproteína de envelope (E3, ~10 kDa) e uma proteína transmembrana pequena (6 kDa) também foram identificadas nos alfavírus. Além da função estrutural, as glicoproteínas do envelope desempenham funções importantes no início da replicação (ligação nos receptores, penetração) e constituem-se em fatores de virulência em modelos animais. As glicoproteínas também possuem atividade hemaglutinante e são alvos de anticorpos neutralizantes.

Os vírions possuem massa molecular 52×10^6 ; densidade *Buoyant* 1.18-1.19 g/cm³-3 em sacarose

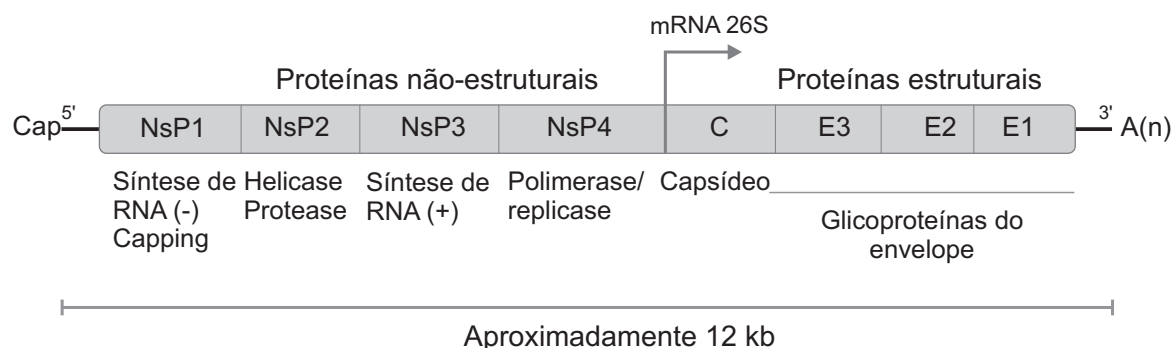
e coeficiente de sedimentação 280S. São sensíveis a solventes orgânicos, detergentes, irradiação e são relativamente instáveis sob condições ambientais. Aproximadamente 30% da massa total dos vírions é composta por lipídios.

O genoma dos alfavírus é uma molécula de RNA de cadeia simples, linear, de polaridade positiva, com extensão de 9.7 (rubivírus) a 11.8 kb (alfavírus) (Figura 23.2). A extremidade 5' possui uma estrutura *cap* e a extremidade 3' é poliadênilada. Pequenas seqüências não-traduzidas são encontradas próximo às duas extremidades e, provavelmente, possuem importância para a transcrição e replicação do genoma. As seqüências traduzíveis (*open reading frames*, ORFs) estão agrupadas em dois módulos: os genes das proteínas não-estruturais (nsPs) estão localizados nos dois terços próximos à extremidade 5' e são expressos pela tradução direta do genoma. As proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 são produzidas pela clivagem da poliproteína precursora. Os genes que codificam as proteínas estruturais (C, E1, E2, E3) fazem parte de uma ORF localizada na região próxima a extremidade 3' do genoma. Esses genes são expressos pela tradução de um RNA mensageiro (mRNA) subgenômico (26S), que é produzido a partir da cópia de RNA de sentido antígenômico. A tradução deste mRNA também resulta na produção de uma poliproteína, cuja clivagem seqüencial resulta nas proteínas estruturais.



Fonte: A) Dra Tuli Mukhopadhyay, UIC (ICTVdB)

Figura 23.1. Vírions da família *Togaviridae*. A) Foto de criomicroscopia eletrônica de vírions do Sindbis purificados; B) Ilustração esquemática do vírion e seus componentes.



Fonte: adaptada de Schlesinger e Schlesinger (1996).

Figura 23.2. Estrutura e organização do genoma dos alfavírus. As prováveis funções dos produtos estão apresentadas abaixo de cada gene.

4 Replicação

Os alfavírus replicam em uma variedade de linhagens celulares, incluindo células BHK-21 (*baby hamster kidney cells*), Vero (*African green monkey kidney*), além de cultivos primários de embriões de galinha (CEF) e de pato. A replicação viral nessas células produz altos títulos de vírus e é acompanhada de citopatologia severa e morte celular. A replicação em células de mosquitos, por outro lado, geralmente não é acompanhada de citopatologia ou alterações aparentes na fisiologia celular, a exemplo do que ocorre *in vivo*. A infecção natural em mosquitos é persistente, sem alterações evidentes na fisiologia do vetor. Células C6/36, derivadas de *Aedes albopictus*, também são rotineiramente utilizadas para amplificar os alfavírus em laboratório.

4.1 O ciclo replicativo

Os alfavírus são capazes de infectar várias espécies *in vivo* e diferentes tipos de células *in vitro*. Para isso, provavelmente são capazes de utilizar diferentes receptores para iniciar a infecção. Alternativamente, podem utilizar um único receptor, mas que esteja presente em todas as espécies e células que infectam. O SIN parece utilizar receptores distintos em diferentes linhagens: o receptor de alta afinidade da laminina em células BHK-21 e em outras células de mamíferos; uma proteína de 63 kDa em células de CEF e proteínas

com 10 e 74 kDa em células de neuroblastoma de camundongos. Moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) têm sido identificadas como receptores para o SFV em células de mamíferos.

A penetração do vírus envolve a interação inicial da proteína E2 e/ou E1 com os receptores na superfície celular, seguida de internalização dos vírions por endocitose. Anticorpos contra a E2 possuem atividade neutralizante, indicando a importância desta glicoproteína no processo de ligação e/ou penetração. A penetração dos nucleocapsídeos no citoplasma ocorre após a fusão do envelope viral com a membrana dos endossomos, o que ocorre sob pH baixo (pH 5 a 6). Classicamente, foi demonstrado que a penetração dos nucleocapsídeos no citoplasma ocorre após a fusão do envelope viral com a membrana dos endossomos sob pH baixo (pH 5 a 6), o que classificaria esses agentes como vírus pH-dependentes. Recentemente foi demonstrado um mecanismo alternativo (ou adicional) de penetração do vírus SIN em células de mamíferos. Esse mecanismo envolveria a formação de estruturas semelhantes a poros, pela proteína E1, na membrana plasmática. Esses poros permitiriam a ejeção do genoma diretamente no citoplasma, sem a penetração do nucleocapsídeo como um todo, a exemplo do que ocorre em alguns vírus sem envelope (poliovírus). As alterações conformacionais na E1 necessárias para a ocorrência desse processo necessitariam pH baixo, mas a penetração do genoma ocorreria

a pH próximo do neutro. A fusão/penetração em células de insetos parece não depender da acidificação dos endossomos. O desnudamento provavelmente ocorra pela interação das proteínas do nucleocapsídeo com os ribossomos da célula hospedeira. No caso do mecanismo recentemente descrito (formação de poros), o genoma já desprovido da maioria das proteínas do nucleocapsídeo seria ejetado no citosol.

A primeira etapa após o desnudamento é a tradução direta de parte do RNA genômico pelos ribossomos. A tradução da ORF dos genes das proteínas não-estruturais (localizada nos dois terços do genoma próximos à extremidade 5') resulta na produção de uma poliproteína que é clivada à medida que vai sendo produzida, dando origem às proteínas não-estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (Figura 23.3). Tem sido demonstrado que a clivagem do precursor nsP1-nsP2-nsP3

ocorre mais tardiamente, ao contrário da clivagem da nsP4, que parece ocorrer imediatamente após a sua produção. No vírus SIN, a atividade polimerase foi mapeada na nsP4, que possui uma sequência GDD presente em várias RNA polimerases virais. Um complexo formado pela nsP4 e por outras nsPs é responsável pela replicação do genoma (complexo replicase), que ocorre via síntese de uma molécula de RNA de sentido antígenômico (polaridade negativa). Esta molécula serve inicialmente de molde para a transcrição dos mRNAs subgenômicos (26S). A nsP2 parece atuar na regulação da síntese da cadeia negativa de RNA e na iniciação da síntese do mRNA subgenômico, além de possuir atividade de protease. A nsP1 possui atividade de metil-transferase.

Os mRNAs subgenômicos (26S) são traduzidos, originando uma poliproteína que é, então, clivada, dando origem às proteínas estruturais

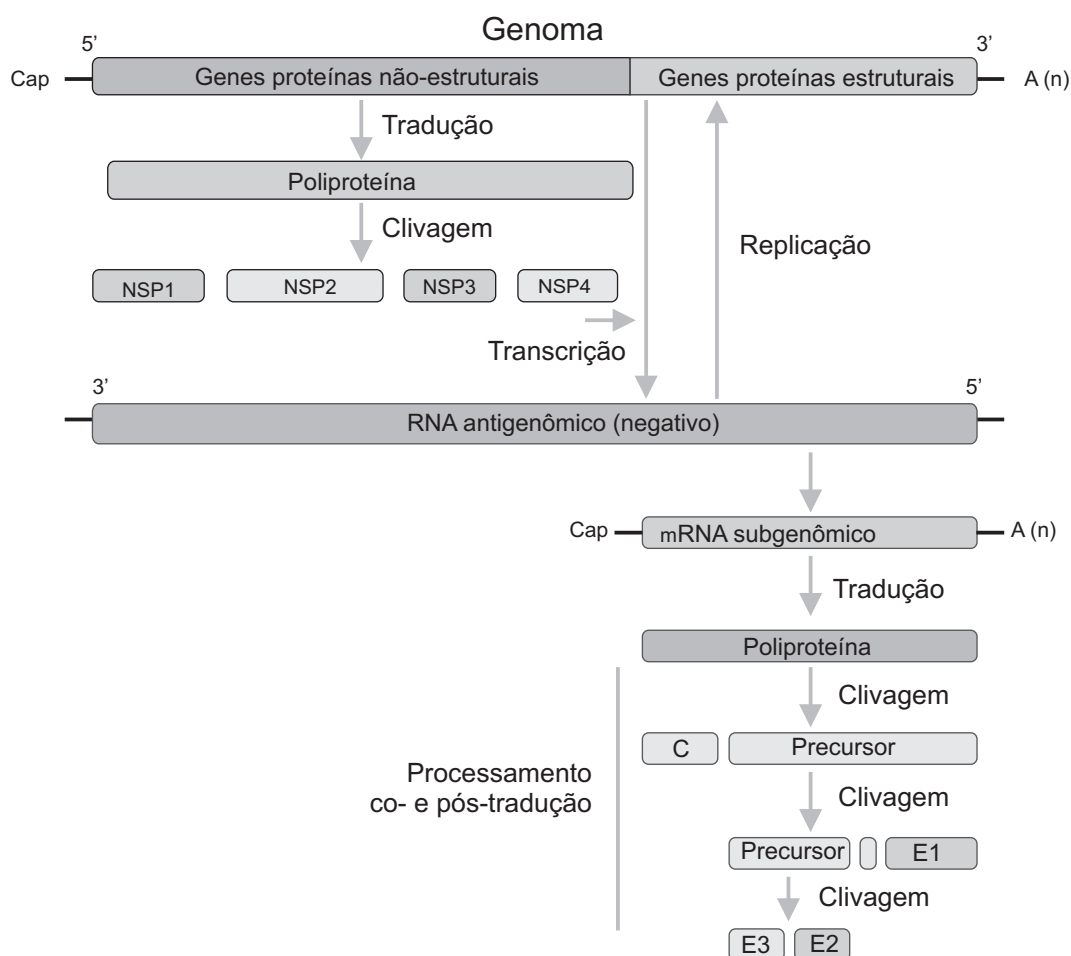


Figura 23.3. Estratégia de expressão gênica e replicação do genoma dos alfavírus.

do capsídeo (pC) e às glicoproteínas do envelope E1 e E2 (e E3 em alguns vírus) (Figura 23.3). As glicoproteínas são sintetizadas pelos ribossomos, associados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER). Após a sua síntese como uma poliproteína precursora (E3-E2-E1), essas glicoproteínas sofrem extensivas modificações pós-traducionais (glicosilação, acilação) no RER e no aparelho de Golgi. Parte dessas alterações e o processamento proteolítico final, que resulta nas glicoproteínas individuais, ocorre no interior de vesículas durante o transporte para a membrana plasmática, onde essas proteínas serão inseridas.

O RNA antigenômico também serve de molde para a síntese de cópias com a sua extensão total, que correspondem ao RNA genômico. Es-

sas cópias podem servir de molde para outros ciclos de tradução e transcrição, e serão, eventualmente, encapsidadas. O complexo replicase é responsável pela síntese do RNA antigenômico, dos mRNAs subgenômicos e das cópias genômicas do RNA.

A montagem dos nucleocapsídeos ocorre associada com membranas no citoplasma, pela conjugação do RNA genômico recém-formado com múltiplas cópias da proteína C. Os nucleocapsídeos são transportados até a membrana plasmática, onde interagem com as caudas das glicoproteínas recém-inseridas e completam a maturação por brotamento. O ciclo replicativo ocorre inteiramente no citoplasma (Figura 23.4).

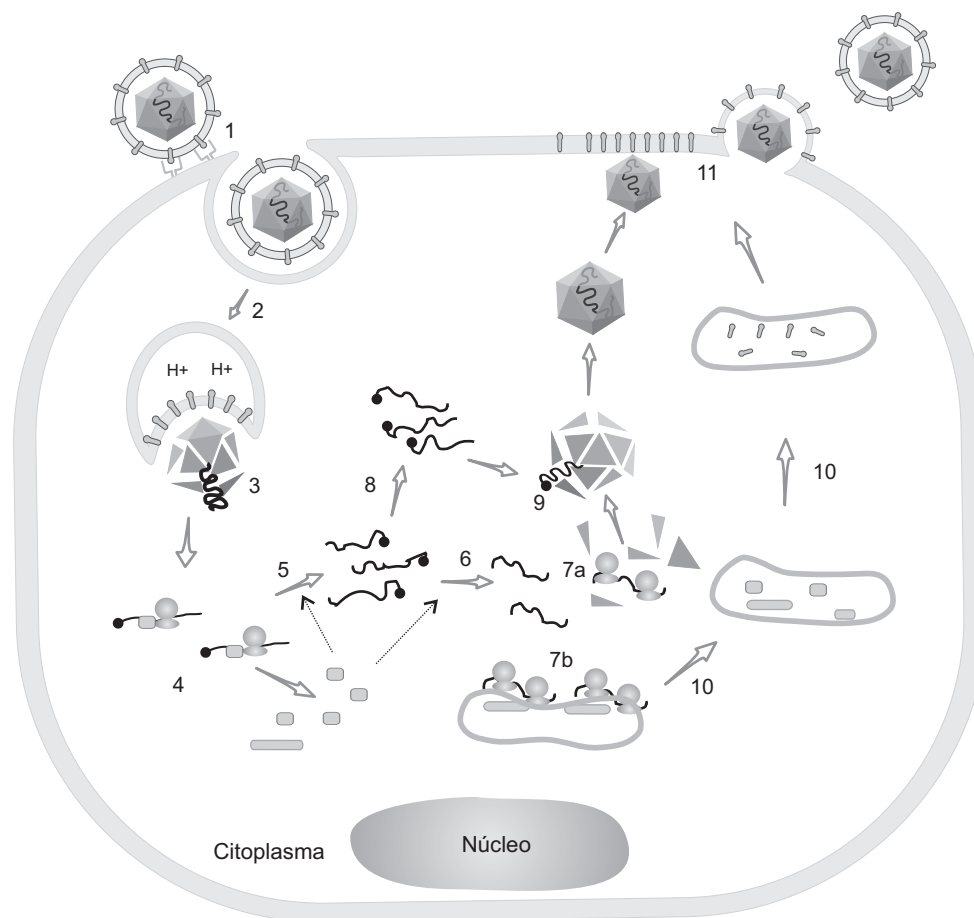


Figura 23.4. Ilustração esquemática do ciclo replicativo dos alfavírus. 1) Ligação nos receptores celulares; 2) Internalização por endocitose mediada por clatrina; 3) Penetração e desnudamento; 4) Tradução parcial do genoma e produção das proteínas não-estruturais (nsPs); 5) Síntese do RNA antigenômico; 6) Transcrição da região das proteínas estruturais e produção do mRNA subgenômico (26S); 7) Tradução do mRNA 26S produzindo as proteínas do capsídeo (7a) e do envelope (7b). 8) Síntese do RNA genômico; 9) Morfogênese dos nucleocapsídeos; 10)

Em células de vertebrados, a replicação dos alfavírus é acompanhada por uma supressão na síntese de macromoléculas celulares. Isso produz distúrbios severos e irreversíveis na fisiologia, que resultam inevitavelmente na morte celular. Em células de inseto, o brotamento e maturação ocorrem em membranas internas, e não na membrana plasmática. Os vírions recém-formados são transportados no interior de vesículas e liberados no meio extracelular por exocitose, sem causar lise celular.

A estratégia de expressão gênica e replicação dos alfavírus e ciclo replicativo estão ilustrados nas Figuras 23.3 e 23.4, respectivamente.

A exemplo de outros vírus RNA, os alfavírus apresentam uma alta taxa de mutações e também estão propensos a recombinações no genoma. Essas mutações e recombinações possuem importância na evolução desses vírus e algumas delas têm sido associadas com alterações de patogenicidade. Os VEEV epizooticos, capazes de produzir altos níveis de viremia e infecção neurológica em eqüinos e humanos, surgem esporadicamente a partir de mutações no genoma dos vírus enzoóticos. Evidências genéticas indicam que o WEEV surgiu por recombinação entre o EEEV e um vírus semelhante ao SIN.

5 Epidemiologia

Os alfavírus são mantidos na natureza por meio de ciclos alternados em hospedeiros verte-

brados e mosquitos. Os mosquitos se infectam durante o repasto sanguíneo em hospedeiros viremicos. Após um período de replicação nos tecidos do inseto, o agente é transmitido a outro hospedeiro pela inoculação de saliva contaminada. O vírus, então, replica no hospedeiro, produzindo viremia e, às vezes, enfermidade.

Os alfavírus apresentam um amplo espectro de hospedeiros *in vivo* e *in vitro*. Uma grande variedade de vertebrados (mamíferos e aves) e insetos é suscetível à infecção natural e experimental por esses vírus. Os hospedeiros naturais dos alfavírus são as aves (várias espécies), pequenos mamíferos (principalmente roedores e marsupiais) e primatas. Infecções naturais já foram relatadas em morcegos e em outros mamíferos pequenos. Os eqüídeos também são freqüentemente infectados por várias espécies de alfavírus, embora o seu papel na epidemiologia da maioria deles permaneça controverso. As consequências da infecção natural nas espécies hospedeiras variam desde infecções subclínicas agudas ou crônicas (aves, insetos) até enfermidades fatais. A capacidade de hospedeiros vertebrados servirem de fonte de infecção e participarem do ciclo de transmissão do agente depende dos níveis de viremia e da preferência específica dos insetos hematófagos. O ciclo natural dessas infecções geralmente não envolve humanos ou animais domésticos, que são hospedeiros acidentais e não participam da transmissão e manutenção do agente na natureza (Figura 23.5).

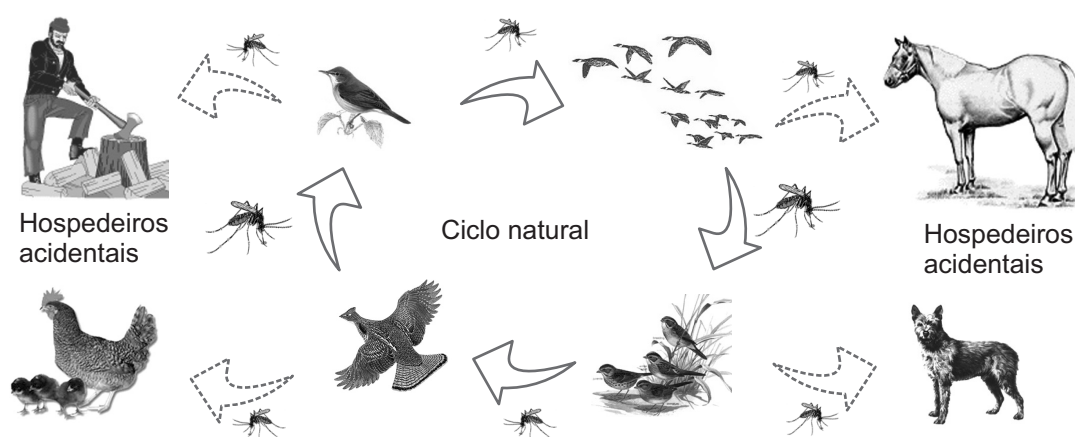


Figura 23.5. História natural dos alfavírus. Várias espécies de aves silvestres são os hospedeiros naturais do vírus, enquanto aves e mamíferos domésticos, além do homem, são hospedeiros acidentais.

As interações específicas entre os vírus, vetores e hospedeiros vertebrados tendem a confinar cada espécie de vírus a determinadas áreas geográficas ou nichos ecológicos. Essa delimitação geográfica, no entanto, não é absoluta e, ocasionalmente, esses vírus podem ser encontrados fora de seus nichos ecológicos naturais. Isso tem ocorrido nas epizootias causadas pelo VEEV, que atingiram o México e Sul dos Estados Unidos; e também com o EEEV e WEEV, que têm sido frequentemente identificados em regiões remotas da América Central e do Sul. Sobreposição de áreas de ocorrência de mais de uma espécie de vírus também tem sido demonstrada para os vírus da VEE.

6 As encefalites eqüinas

(ou encefalomiелites eqüinas)

Vários alfavírus são associados com infecção e enfermidade do sistema nervoso central (SNC) de eqüinos (ver Tabela 23.1). Na maioria dos casos, esses animais são hospedeiros acidentais (ou terminais) e não participam do ciclo de transmissão desses vírus. Embora alguns alfavírus do Velho Mundo possam causar encefalite, os alfavírus das Américas é que estão mais frequentemente envolvidos em epizootias em eqüinos e são denominados genericamente de *vírus das encefalites eqüinas*. Esse complexo de vírus abrange os vírus das encefalites do Leste (EEEV), Oeste (WEEV) e venezuelana (VEEV). As infecções por esses vírus possuem certa delimitação geográfica, sobretudo por condições ecológico-ambientais que proporcionam interações do agente com seus hospedeiros naturais e insetos vetores. Não obstante, esses vírus são frequentemente detectados fora de suas regiões originais, o que demonstra que os limites geográficos de sua distribuição são tênues e relativos.

A abrangência geográfica dos vírus do complexo VEEV é maior e compreende desde o Norte da Argentina até os EUA, com atividade viral notadamente maior no Norte e Noroeste da América do Sul, América Central e México. Nas últimas décadas, epizootias/epidemias associadas ao VEEV têm vitimado centenas de milhares de

eqüinos e milhares de pessoas nas Américas. Em contraste, a EEE e a WEE possuem importância predominantemente regional nos EUA (embora essas viroses já tenham sido detectadas em outros países, inclusive no Brasil) e o número de casos (eqüinos e humanos) tem sido muito menor. A ecologia dessas viroses tem vários aspectos em comum, porém difere em relação aos hospedeiros naturais, vetores e participação dos eqüinos no ciclo de transmissão do vírus.

As infecções pelos alfavírus das encefalites eqüinas têm sido detectadas no Brasil desde o início do século XX. O EEEV já foi isolado de eqüinos nos estados de São Paulo, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro; e o WEEV já foi isolado de cavalos no estado do Rio de Janeiro. A presença desses dois vírus na região Amazônica foi demonstrada por sorologia e/ou por isolamento do agente de eqüinos, mosquitos, aves e mamíferos silvestres. A infecção pelo EEEV tem sido demonstrada por exames sorológicos em pessoas no Vale do Ribeira (SP), em aves e eqüinos do Pantanal (MS) e na Mata Atlântica (SP). O VEEV também foi isolado de primatas na região Amazônica e de mosquitos e morcegos na região Sudeste do País. No final da década de 1990, o VEEV foi associado a um surto de encefalite em cavalos no Paraná. Outros estudos sorológicos têm demonstrado a circulação desses e de outros arbovírus em várias regiões do Brasil, principalmente nas regiões Sudeste (Mata Atlântica), Centro-Oeste (Pantanal Mato-grossense) e Norte (Amazônia).

Pela sua importância e impacto em saúde animal e pela sua abrangência, que atinge boa parte do território brasileiro, este capítulo abordará, com mais detalhes, a encefalite eqüina venezuelana (VEE). As encefalites oeste (WEE) e leste (EEE) serão abordadas resumidamente no final.

6.1 Encefalite eqüina venezuelana

Os agentes da encefalite eqüina venezuelana (VEE) são os alfavírus mais importantes de eqüinos e humanos das Américas. Surto de doença febril e encefalite têm sido frequentemente

descritos na América Latina nas últimas décadas, envolvendo milhares de eqüinos e humanos. Os primeiros casos da enfermidade foram descritos, em 1930, no Norte da América do Sul, e afetaram eqüinos, asininos e muares. Entre 1938 e 1973, vários surtos de proporções consideráveis ocorreram a intervalos de aproximadamente 10 anos no Norte e Noroeste do Continente Sul-Americano. Um surto de proporções maiores ocorreu na América Central e México entre 1969 e 1972, afetando e matando milhares de eqüídeos e centenas de pessoas. Um esforço internacional integrado conseguiu controlar o surto em 1972. A ausência de relatos da doença na região, entre 1973 e 1992, levantou a suspeita de uma possível extinção dos agentes. No entanto, vários casos foram descritos na última década, reacendendo as discussões sobre a enfermidade e colocando-a entre as principais doenças emergentes de animais e humanos das Américas.

Surtos de menores proporções, atingindo eqüinos e humanos, foram descritos na Venezuela em 1992. No México, os eventos mais recentes afetaram apenas eqüinos. Em 1993, foram relatados 125 casos, resultando em 63 mortes; em 1996, 32 eqüinos foram afetados e 12 morreram. Desde então, casos esporádicos em cavalos têm sido descritos no México e em países da América Central, confirmando o caráter enzoótico da infecção.

O surto de maior proporção ocorreu em 1995 e atingiu entre 75.000 e 100.000 pessoas (mais de 300 mortes) e milhares de eqüinos e muares na Venezuela e Colômbia. As medidas de emergência incluíram a vacinação de mais de 100.000 eqüinos na Colômbia, combate aos vetores e restrição à movimentação de animais. Esse esforço impediu a disseminação da infecção na direção sul. Nos anos de 1999, 2000 e 2003, pequenos focos localizados de VEE foram relatados em algumas regiões da Venezuela. Embora com menor frequência e proporções, casos esporádicos e inclusive surtos de VEE, têm sido descritos em outros países da América do Sul. A história natural da enfermidade, incluindo a persistência do agente em reservatórios silvestres e a existência de condições ecológico-epidemiológicas apropriadas indicam que tais eventos continuarão a ocorrer.

6.1.1 O agente

O VEEV pertence a um grupo de alfavírus antigenicamente relacionados que compõe o complexo VEE. O complexo VEE abrange seis diferentes subtipos e várias espécies e variantes (Tabela 23.2). Esses vírus são agrupados de acordo com a sua relação antigênica, e cada grupo apresenta virulência e potencial epizootico distintos. Dentre esses, apenas os subtipos IAB e IC têm sido associados com epizootias/epidemias e utilizam eqüinos para a sua amplificação e disseminação e, por isso, são denominados VEEV *epizooticos*. Os outros sorotipos (ID e IE) e os demais vírus do complexo VEE possuem ocorrência enzoótica e são geralmente avirulentos para a espécie eqüina. Os vírus *enzoóticos* são mantidos por meio de ciclos de infecção em pequenos mamíferos e insetos em florestas ou regiões pantanosas, são avirulentos para eqüinos e parecem não utilizar essa espécie para amplificação e manutenção.

As características morfológico-estruturais e o esquema geral de replicação do VEEV parecem não diferir muito do que foi estabelecido para os vírus protótipos SIN e SFV. O VEEV utiliza a proteína ligante da laminina como receptor celular, mas passagens múltiplas em cultivo podem selecionar mutantes da glicoproteína E2 capazes de se ligar ao sulfato de heparina. O VEEV apresenta um estreito espectro de vetores susceptíveis, cada espécie de vírus sendo capaz de replicar em uma ou poucas espécies de mosquitos.

6.1.2 Epidemiologia

A distribuição dos subtipos do complexo VEEV nas Américas, de acordo com os surtos ocorridos no último século, está apresentada na Figura 23.6. Os vírus enzoóticos são mantidos perenemente em ciclos silvestres silenciosos (sem causar doença em espécies domésticas) nas florestas e regiões pantanosas da América Central e Norte-Noroeste da América do Sul. Os VEEV epizooticos têm sido associados com epizootias periódicas em eqüinos, algumas vezes associadas com epidemias em humanos, principalmente no Norte e Noroeste da América do Sul. As áreas

Tabela 23.2. Alfavírus do complexo VEEV, padrões de transmissão, espécies afetadas, vetores e distribuição

Subtipo	Espécie (vírus)	Variante	Padrão de transmissão	Patógeno equino	Distribuição	Vetor
I	VEEV	AB	Epizootica	Sim	Américas (Sul,	Mosquitos mamíferofílicos
	VEEV	C	Epizootica	Sim	América do Sul	Mosquitos mamíferofílicos
	VEEV	D	Enzoótica	Não	América do Sul e Central	<i>C.aikenii</i> ; <i>C.vomerifer</i> , <i>C.pedroi</i> , <i>C. adamesi</i>
	VEEV	E	Enzoótica	Variável	América Central e México	<i>C.taeniopus</i>
	Mosso das Pedras	F	Enzoótica	?	Brasil	Desconhecido
II	Everglades		Enzoótica	Não	Sul da Flórida (EUA)	<i>C.cedecei</i>
III	Mucambo	A	Enzoótica	Não	América do Sul	<i>C.portesi</i>
	Tonate	B (Bijou)	Enzoótica	?	América do Sul e do Norte	<i>Oecieus vicarius</i>
	Mucambo	C (71D1252)	Enzoótica	?	Oeste do Peru	Desconhecido
	Mucambo	D (V407660)	Enzoótica	?	Oeste do Peru	Desconhecido
IV	Pixuna		Enzoótica	?	Brasil	Desconhecido
V	Cabassou		Enzoótica	?	Brasil	Desconhecido
VI	Rio Negro		Enzoótica	?	Norte da Argentina	<i>C. delponte</i>

Fonte: adaptado de Weaver et al. (2004)

de ocorrência de cada sorotipo são exclusivas e auto-excludentes e estendem-se desde o Norte da Argentina até as Montanhas Rochosas nos EUA. Uma exceção é a ocorrência concomitante de três subtipos (IC, IIIC e IIID) na Floresta Amazônica peruana. A especificidade das interações entre as diferentes espécies de vírus, seus vetores e hospedeiros naturais, aliada à existência de barreiras naturais pode explicar a delimitação geográfica dessas viroses. No entanto, alguns subtipos ou variantes têm sido ocasionalmente identificados fora de seus nichos ecológicos originais.

Pelo menos dez espécies de mosquitos podem participar da epidemiologia e transmissão dos vírus da VEE, incluindo os gêneros *Culex* sp. e *Aedes* sp., e a eficiência de transmissão varia entre as diferentes espécies de vetor e de vírus. Os hospedeiros naturais dos vírus do complexo VEE são pequenos mamíferos (principalmente roedores). Os vírus enzoóticos são mantidos na natureza por ciclos alternados nessas espécies e em

mosquitos. Os roedores parecem desempenhar um papel preponderante como hospedeiros desses vírus nas diversas regiões de ocorrência. Pequenos marsupiais e morcegos também têm sido sugeridos como possíveis hospedeiros. Embora as aves não possuam papel importante como reservatórios, pássaros costeiros podem participar da disseminação desses agentes. Os vírus enzoóticos geralmente não causam doença em equinos; no entanto, casos esporádicos de doença febril e, ocasionalmente, encefalites têm sido descritos em humanos.

A origem dos VEEV epizooticos, associados com surtos periódicos de encefalite em equinos e humanos, constituiu-se em um tema de intensas investigações durante décadas. As epizootias ocorriam aproximadamente a cada dez anos, sem atividade viral detectável nos intervalos entre os surtos. Uma característica comum dessas epizootias era a participação de equinos na amplificação do vírus. Embora humanos, ovinos, cães, roedo-

res, morcegos e algumas espécies de aves sejam susceptíveis aos VEEV epizoóticos. Em todas as epidemias reportadas havia o envolvimento preponderante de eqüinos. Evidências recentes indicam que os VEEV epizoóticos surgem esporadicamente a partir de mutações de VEEV enzoóticos (principalmente do tipo ID), ou seja, os VEEV enzoóticos, avirulentos e pouco capazes de serem amplificados em eqüinos seriam mantidos na natureza através de ciclos alternados em pequenos mamíferos e insetos. Mutações esporádicas nesses vírus resultariam em variantes com espectro de hospedeiro e virulência alterados

(VEEV epizoóticos), capazes de serem amplificados e causarem doença grave em eqüinos (Figura 23.7). O surgimento de VEEV epizoóticos a partir de vacinas mal inativadas também parece ter contribuído para algumas epizootias. Recentemente foi demonstrado que os VEEV epizoóticos podem se manter na natureza por vários anos após o término das epizootias, embora o mecanismo de persistência ainda não tenha sido determinado. Infecções agudas ou persistentes em outras espécies animais (bovinos, roedores) e a utilização de outros artrópodes como vetores têm sido sugeridos para explicar essa persistência. A



Fonte: adaptada de Weaver et al. (2004).

Figura 23.6. Ocorrência e distribuição de surtos associados com os diferentes subtipos do complexo VEEV nas Américas.

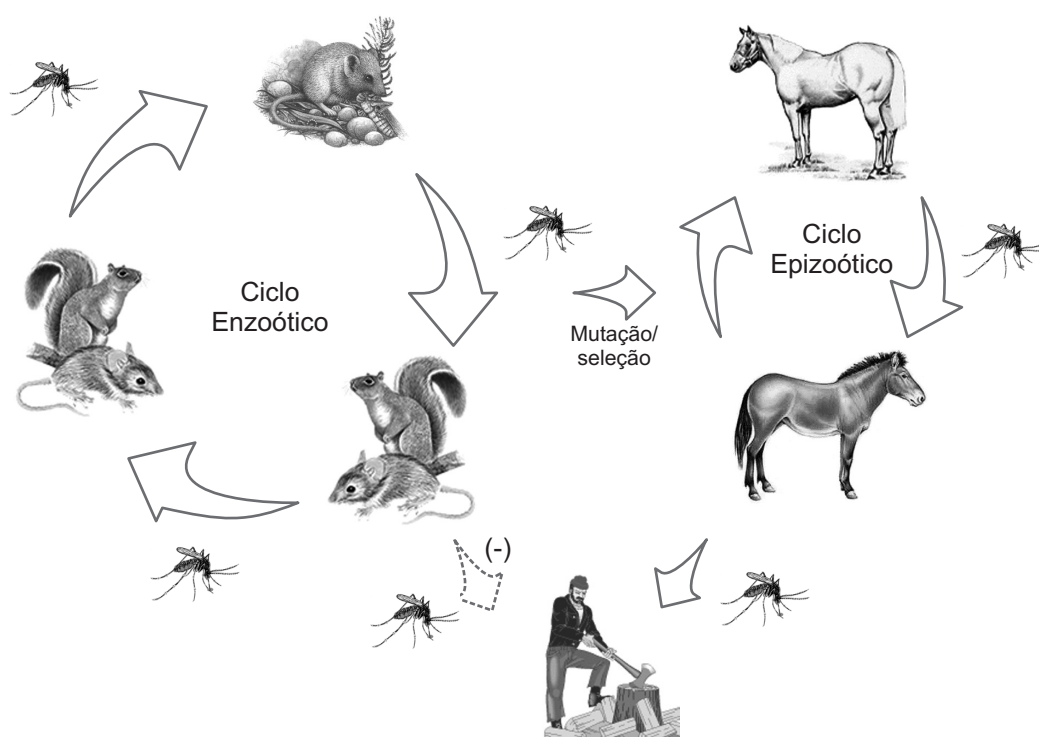


Figura 23.7. História natural e epidemiologia dos VEEV enzoóticos e epizoóticos.

transmissão vertical do vírus à prole, através da infecção dos ovos, pode contribuir para a manutenção do vírus na população de mosquitos.

Uma vez gerados por mutações dos vírus enzoóticos, os VEEV epizoóticos podem utilizar uma variedade de espécies de mosquitos para a sua disseminação. Devido à ampla e rápida disseminação que ocorre entre equinos e à proximidade desses animais com humanos, as epizootias estão frequentemente associadas com epidemias em pessoas. Esses episódios têm apresentado dimensões variáveis – desde casos isolados até dezenas de milhares de casos. Embora possível, a participação de humanos na amplificação e disseminação dos VEEV nas grandes epidemias parece ser limitada, devido à exposição restrita dos humanos aos mosquitos vetores. No entanto, o potencial de disseminação dos VEEV epizoóticos por mosquitos urbanos, como o *Aedes aegypti*, não deve ser negligenciada. Uma grande epidemia que ocorreu nos arredores de Maracai-bo (Venezuela) sugere que outros vetores e/ou transmissão entre humanos possam ter participado da disseminação do agente. Outros insetos (moscas, carrapatos e outros ácaros) podem,

ocasionalmente, participar da transmissão mecânica dos VEEV. Uma característica única que diferencia os VEEV dos outros alfavírus é a sua alta infectividade em aerossóis. Com isso, o vírus poderia infectar hospedeiros por inalação. A importância dessa via de transmissão na epidemiologia da infecção é desconhecida, porém parece ser limitada.

6.1.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a inoculação pela picada do mosquito vetor, o vírus replica em tecidos próximos ao local de inoculação e nos linfonodos regionais, produzindo uma viremia primária. A replicação secundária ocorre em órgãos linfóides e em tecidos musculares, resultando em uma viremia secundária e eventual invasão do cérebro. O vírus também pode replicar no trato respiratório superior, pâncreas e fígado. A partir do sangue, o vírus pode invadir o cérebro por transporte passivo através do endotélio vascular, replicação nas células endoteliais, infecção do plexo coróide e epêndima e/ou por transporte no interior de mo-

nócitos e linfócitos. Em animais de laboratório, o VEEV parece utilizar vias nervosas para invadir o encéfalo a partir da cavidade nasal ou de sítios periféricos.

Diferentemente de outros alfavírus, os sítios preferenciais de replicação do VEEV fora do SNC são os órgãos linfóides. A replicação do VEEV está associada com depleção linfóide na medula óssea e destruição de linfócitos nos linfonodos e baço. Os quadros de encefalite são acompanhados por várias alterações histopatológicas que incluem infiltração neutrofílica, degeneração neuronal, vasculite necrosante e destruição de células de Purkinje.

A patologia da infecção pelo VEEV tem sido estudada mais detalhadamente em animais de laboratório como *hamsters*, cobaias e camundongos. Após um período de viremia, o vírus é eliminado do sangue e tecidos periféricos após 4 a 5 dias. A depleção linfóide é geralmente passageira, e os órgãos linfóides afetados retornam à sua aparência e constituição quase normais após poucos dias. O vírus pode ser detectado no cérebro entre o 2º e 3º dia após a inoculação intranasal e parece atingir o encéfalo através dos nervos olfatórios. A invasão do encéfalo após inoculação periférica também parece ter a participação de vias nervosas. No encéfalo, os principais alvos do vírus são os neurônios, e quadros de encefalite clássica, com manguitos perivasculares e infiltração linfocitária, são frequentes.

A infecção pelos vírus do complexo VEE – tanto em eqüinos como em humanos – pode estar associada a uma variedade de manifestações, indo desde infecções subclínicas até encefalite de curso fatal. Os sorotipos enzoóticos (I-E, II, III e IV) são avirulentos para eqüinos e, geralmente, produzem níveis baixos de viremia, sem produzir sinais clínicos. Alguns VEEV enzoóticos podem ser virulentos para humanos. Os sorotipos epizooticos (IAB e IC), geralmente, produzem altos títulos de viremia em eqüinos e são virulentos para essa espécie e para humanos.

A infecção em humanos, geralmente, resulta em doença febril com sinais clínicos sistêmicos (hipertermia, calafrios, letargia, cefaléia). O envolvimento do sistema nervoso central (encefalite) ocorre apenas esporadicamente (menos de 0,5% dos adultos e até 4% das crianças) e é mais

leve do que os quadros associados com o EEEV e WEEV. Os sinais iniciais de letargia, sonolência e confusão mental leve podem progredir para vertigens, ataxia, rigidez na nuca, paralisia e coma, em casos severos. Em epidemias com sorotipos epizooticos altamente neurovirulentos, quadros de encefalite podem ser observados em 4 a 14% das pessoas infectadas.

A infecção de eqüinos com os VEEV epizooticos é seguida do aparecimento de sinais clínicos sistêmicos (hipertermia, depressão, taquicardia, anorexia) entre o 2º e 5º dia pós-infecção. O percentual de animais que evolui para a infecção neurológica e morte é variável e parece estar diretamente relacionado com o nível de viremia produzido. Os VEEV epizooticos, geralmente, produzem altos títulos de viremia, o que parece ser raro entre os vírus enzoóticos. Isso sugere que a neurovirulência está associada com a capacidade do vírus de replicar em tecidos extraneurais e, a partir daí, invadir o cérebro.

A progressão da enfermidade sistêmica para a morte, sem a ocorrência de manifestações neurológicas, é relativamente frequente. Nos animais que evoluem para a infecção neurológica, os sinais específicos geralmente são observados de 5 a 10 dias após a infecção. Esses animais podem apresentar incoordenação motora, andar em círculos, cegueira parcial, fotofobia, dificuldade de deglutição, bruxismo e hiperexcitabilidade. Em fases avançadas, podem ocorrer ataxia, paralisia, decúbito e convulsões. Em infecções experimentais, a morte ocorre aproximadamente sete dias após o início dos sinais clínicos. Em surtos naturais causados por VEEV epizooticos, a taxa de letalidade pode atingir 50 a 70% dos animais acometidos. Os animais que se recuperam podem permanecer com seqüelas neurológicas. Outros animais domésticos, como cães, caprinos, ovinos e coelhos, também são frequentemente afetados durante as epizootias e podem desenvolver doença febril e encefalite fatal.

6.1.4 Imunidade

A infecção natural pelo VEEV induz imunidade de longa duração, provavelmente por toda a vida do animal. A proteção contra vírus heterólogos pode ocorrer e depende do grau de similaridade antigênica entre os vírus.

Durante a infecção aguda, o aparecimento de anticorpos neutralizantes coincide com o desaparecimento do vírus do sangue, indicando a importância desses anticorpos na resolução da viremia e na recuperação da doença clínica. Em exposições subsequentes, os anticorpos neutralizantes parecem desempenhar um papel importante na prevenção e limitação da replicação viral. Acredita-se que os linfócitos T citotóxicos também desempenhem um papel importante, sobretudo, na resolução da infecção primária.

6.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da enfermidade em eqüinos deve considerar os aspectos clínicos (doença sistêmica progressivamente grave, podendo estar associada com sinais neurológicos), epidemiológicos (histórico da doença na região, presença e exposição a mosquitos vetores, outros eqüinos afetados). Sinais típicos de encefalite em regiões endêmicas devem ser considerados potencialmente suspeitos de infecção pelo VEEV e investigados. No entanto, quadros de encefalite bem caracterizados nem sempre estão presentes, o que pode confundir a suspeita inicial. Além disso, animais infectados pelo VEEV também podem morrer subitamente, sem manifestar sinais clínicos evidentes.

A enfermidade causada pelo VEEV pode ser confundida com outras doenças que produzem manifestações neurológicas, como as encefalites do oeste (WEE) e do leste (EEE), pelo vírus do Nilo Ocidental (WNV), peste eqüina, tétano, raiva, meningite bacteriana e algumas intoxicações. Essas doenças devem ser consideradas para o diagnóstico diferencial.

O diagnóstico definitivo requer a realização de testes sorológicos e/ou isolamento e identificação do vírus e/ou de antígenos virais. O diagnóstico laboratorial mais empregado em eventos epidêmicos é a sorologia. Testes imunoenzimáticos de captura (ELISA), para detectar imunoglobulinas da classe IgM específicas para o VEEV, são utilizados no diagnóstico da infecção aguda. A confirmação pode ser realizada por testes de soro-neutralização (SN) ou inibição da hemaglutinação (HI) com amostras pareadas de soro.

O isolamento do vírus de animais doentes é difícil, pois a viremia é geralmente transitória. Em animais que morrem ou são sacrificados, tentativas de isolamento do vírus do cérebro podem produzir bons resultados. Inoculação intracerebral em camundongos lactentes ou em células de cultivo (Vero, BHK-21) são os métodos mais utilizados em tentativas de isolamento do agente. Técnicas moleculares de detecção de ácidos nucléicos virais (RT-PCR) ou proteínas (imunotoquímica) têm sido implementadas na rotina laboratorial e permitem a detecção do agente em fluidos corporais, em tecidos frescos ou fixados.

Em casos de isolamento positivo (efeito citopático nos cultivos, doença neurológica e morte nos camundongos), o agente deve ser identificado por técnicas imunológicas, utilizando-se anticorpos monoclonais ou policlonais específicos. A diferenciação entre sorotipos é particularmente importante para diferenciar-se entre os VEEV enzoóticos e epizooticos. Nesses casos, a diferenciação pode ser realizada por testes de HI e SN ou por sequenciamento de regiões específicas do genoma.

6.1.6 Controle e profilaxia

A medida mais eficiente para prevenir a ocorrência de casos de VEE em regiões endêmicas é a vacinação sistêmica de eqüinos. Programas oficiais de vacinação com distribuição gratuita de vacinas têm sido implementados durante e após os surtos na Venezuela, Colômbia e México. Esses programas têm sido eficientes para limitar a circulação de vírus e a ocorrência da doença. Infelizmente, esses programas não são mantidos por longo tempo após os surtos. Como consequência, a imunidade da população se reduz gradativamente e atinge níveis baixos em 5 a 10 anos e também pela substituição gradativa dos animais imunizados.

A vacina viva modificada TC-83 tem sido amplamente utilizada em vários países da América Latina e produz imunidade rápida e duradoura. Essa vacina foi obtida por 83 passagens do VEEV em células de coração suíno e é produzida no México, Venezuela e Colômbia. É utilizada para vacinar eqüinos durante surtos e também

em períodos sem atividade viral detectável e também para vacinar técnicos de laboratório que trabalham com o agente. Uma versão multivalente inativada da TC-83, contendo também antígenos do EEEV e WEEV, tem sido utilizada nos EUA e em alguns países da América do Sul. A imunidade induzida por essa vacina deixa a desejar e, por isso, não é recomendada para regiões endêmicas. Recentemente, uma vacina geneticamente manipulada (cepa 3526) foi desenvolvida e, provavelmente, irá substituir a TC-83, tanto para eqüinos como para humanos.

A limitação do movimento de eqüinos durante os surtos não tem sido efetiva no controle desses eventos, pois os animais são assintomáticos durante um a três dias após a infecção. O controle de mosquitos por inseticidas aplicados por via aérea foi utilizado em alguns surtos que apresentam envolvimento humano. A prevenção da infecção humana pode ser obtida evitando-se a exposição aos mosquitos vetores e pelo uso de repelentes. Essas medidas são particularmente importantes para pessoas que vivem ou trabalham nas proximidades de eqüinos em regiões endêmicas com grande atividade dos vetores (várzeas, florestas) e durante os surtos.

6.2 Encefalite eqüina do leste

O vírus da EEE é um dos membros do complexo das encefalites eqüinas, antigenicamente relacionado, mas distinto do VEEV e WEEV. O agente tem sido identificado no Norte da América do Sul, Brasil, América Central e Caribe, mas a infecção ocorre, principalmente, em várzeas e regiões pantanosas próximas ao litoral do oceano Atlântico e Golfo do México no Sudeste dos Estados Unidos. O EEEV já foi esporadicamente detectado em áreas continentais mais internas dos Estados Unidos. O envolvimento humano é esporádico, com apenas 163 casos tendo sido reportados nos EUA desde 1964. Por outro lado, os eqüinos e também criações de aves domésticas (faisões e emas) têm sido freqüentemente afetados. Outras espécies domésticas, como cães, têm sido esporadicamente afetadas. Os vírus da EEE são tradicionalmente classificados em variantes

antigênicos norte e sul-americanas com base em testes de HI.

6.2.1 Epidemiologia

O vírus é mantido em áreas alagadiças de água salgada ou doce, próximas à região costeira, em ciclos que envolvem várias espécies de pássaros silvestres e uma espécie principal de mosquito, o *Culiseta melanura*. Esse mosquito se alimenta apenas em aves e não transmite o agente a outros hospedeiros. As aves infectadas normalmente não desenvolvem enfermidade. O EEEV, geralmente, aparece nas populações de pássaros no final da primavera, é amplificado pela transmissão entre pássaros durante o verão e atinge níveis muito altos no final do verão e no início do outono. Em algumas regiões, como o sul do estado de New Jersey, esse ciclo ocorre durante todo o ano. Em alguns anos, a infecção permanece restrita aos pássaros sem o envolvimento de eqüinos e humanos. No entanto, sob certas condições climáticas, as populações de vetores e vírus podem ser amplificadas de tal maneira que proporcionem condições para que o vírus escape de seu nicho ecológico. Nessas situações, mosquitos que se alimentam em aves e em mamíferos podem adquirir o vírus ao se alimentar em aves durante a fase virêmica e transmiti-lo a outras espécies (principalmente eqüinos e humanos).

Os mosquitos de várzeas de água doce, *Cochlioides perturbans*, e de água salgada, *Ochlerotatus sollicitans*, são os principais transmissores do agente aos eqüinos, e parecem se constituir no elo de ligação entre o ciclo silvestre e os animais domésticos. Os eventos de escape do vírus de seu *habitat* e a transmissão a outras espécies podem ocorrer em níveis baixos ao longo do ano, mas são mais freqüentes e epidemiologicamente importantes da segunda metade do verão até o início do outono. Nessa época, casos de enfermidade em pessoas, eqüinos e em outras espécies de animais domésticos ocorrem com maior freqüência. A transmissão aos eqüinos ocorre exclusivamente pela picada de mosquitos que haviam previamente realizado repasto sangüíneo em aves virêmicas.

Além do envolvimento de eqüinos, surtos do EEEV têm sido descritos em criações de faisões, emas, frangos de corte, marrecos-de-pequim e de algumas aves silvestres ameaçadas de extinção. A infecção é introduzida e transmitida nessas criações por mosquitos vetores. Índices consideráveis de morbidade, mortalidade e prejuízos econômicos têm sido relatados. Por isso, vacinas de uso eqüino têm sido utilizadas para minimizar o impacto econômico e ecológico desses eventos.

6.2.2 Patogenia e sinais clínicos

A infecção em eqüinos pode cursar com uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde infecção inaparente, doença sistêmica sem sinais neurológicos, até doença neurológica e morte. O período de incubação é de, aproximadamente, cinco dias, após o qual os animais começam a apresentar hipertermia, depressão, anorexia, sonolência e fraqueza. A doença neurológica é mais pronunciada e severa do que nas infecções pelo WEEV e VEEV e cursa com distúrbios visuais (cegueira parcial ou total), fotofobia, bruxismo, disfagia, incoordenação motora, pressionamento da cabeça contra anteparos, andar em círculos, ataxia, paralisia, coma e morte. Irritabilidade e agressividade também podem ocorrer. A taxa de letalidade pode atingir 90%. Os animais que se recuperam após um curso leve podem apresentar seqüelas neurológicas. A patologia é similar às outras encefalites, porém sem o envolvimento do sistema linforreticular, como observado na infecção pelo VEEV.

Em humanos, a infecção pode causar uma variedade de manifestações. A maioria dos indivíduos infectados não apresenta sinais clínicos; uma parcela apresenta sinais inespecíficos (hipertermia, cefaléia, calafrios, faringite); e poucos demonstram envolvimento neurológico, com febre abrupta, cefaléias severas, vertigens, rigidez na nuca, coma e morte. Aproximadamente a metade destes pacientes vai a óbito. É comum (aproximadamente 35%) a ocorrência de seqüelas neurológicas permanentes nos indivíduos que sobrevivem à doença neurológica.

6.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser confirmado por testes laboratoriais. A detecção de IgM na fase aguda por testes imunoenzimáticos é o método de eleição. Sorologia pareada por SN ou HI também podem ser realizadas. O isolamento do vírus do sangue é dificultado pela transitoriedade da viremia. Detecção de ácidos nucléicos virais no sangue ou em tecidos (por PCR) e de proteínas em cortes de tecidos congelados ou parafinizados (por imunoistoquímica) também têm sido utilizados.

6.2.4 Controle e profilaxia

A vacinação de eqüinos nas áreas endêmicas é o método mais eficiente de controle. Vacinas monovalentes, bivalentes (+WEEV) e trivalentes (WEEV+VEEV) inativadas têm sido utilizadas nessas áreas. Não há vacinas para uso humano. A prevenção da infecção humana deve basear-se na prevenção à exposição aos vetores e no uso de repelentes nas áreas endêmicas.

6.3 Encefalite eqüina do oeste

A WEE é causada por um alfavírus (WEEV) antigenicamente relacionado com o EEEV (84% de homologia de aminoácidos) e pertencente ao mesmo grupo antigênico do SIN. O WEEV parece ter se originado de recombinação entre o VEEV e um vírus do grupo do Sindbis. Tanto o WEEV como o EEEV apresentam uma alta frequência de mutações e recombinações. A caracterização genética do WEEV tem sugerido que esses vírus se originam de isolados enzoóticos por mutações e seleção. Os vírus enzoóticos são aparentemente avirulentos para eqüinos. A enfermidade foi, inicialmente, descrita nos Estados Unidos em 1930. Em 1941, uma epizootia/epidemia atingiu 300.000 eqüinos e mais de 3.000 pessoas. Desde então, eventos epidêmicos de pequenas proporções ou casos isolados têm sido ocasionalmente relatados. De 1964 até 2005, foram descritos 639 casos em pessoas. A maioria dos casos envolveu pessoas que vivem ou adquiriram a infecção no meio rural, *habitat* dos reservatórios naturais do

agente. Embora já tenha sido detectada em outros países das Américas, a infecção pelo WEEV ocorre principalmente nas planícies e vales do Centro e Oeste dos EUA e Sul do Canadá.

6.3.1 Epidemiologia

A expansão da agricultura irrigada nas planícies e vales da região Central e Oeste dos EUA e no Canadá criou condições que favoreceram a perpetuação do agente. O WEEV é mantido em ciclos alternados em pássaros e outras aves silvestres (e também domésticas) e insetos. Os mosquitos do gênero *Culex* sp. parecem ser os principais vetores, embora os *A. melanimon* e *A. dorsalis* também sejam vetores eficientes. A agricultura irrigada e as condições climáticas apropriadas favorecem a ocorrência de superpopulações de *Culex tarsalis* e a conseqüente manutenção da infecção. Pássaros silvestres que se alimentam de grãos nessas lavouras constituem-se nos reservatórios naturais e amplificadores do vírus. O ciclo natural do agente envolve principalmente pássaros, mas pode envolver também pequenos mamíferos silvestres. Os eqüinos e humanos são hospedeiros acidentais e parecem não participar do ciclo de transmissão do agente. A capacidade do WEEV em replicar em mosquitos a temperaturas relativamente baixas permite a ocorrência da infecção desde o início do verão até início do outono, e também em algumas regiões do Canadá.

6.3.2 Patogenia e sinais clínicos

A infecção de eqüinos pelo WEEV pode variar desde subclínica até encefalite de curso fatal. O quadro de encefalite é geralmente mais freqüente e mais característico do que nas infecções pelo VEEV, mas geralmente menos severo do que na infecção pelo EEEV. As manifestações clínicas são semelhantes. A patogenia e patologia são similares ao VEEV e EEEV, porém sem o envolvimento linforreticular e sistêmico (fígado, baço e sistema respiratório) observado nas infecções pelo VEEV. Os índices de fatalidade podem atingir entre 20 e 40% dos animais afetados.

A infecção humana é acidental e geralmente cursa de forma subclínica ou com sinais clínicos

leves (hipertermia, cefaléia e sonolência); raramente ocorrem sinais neurológicos severos, encefalite e coma. A doença é geralmente mais branda do que a associada com o EEEV, mas é geralmente mais grave em crianças, podendo atingir índices de fatalidade de até 10%.

6.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser confirmado por testes laboratoriais. Os mesmos procedimentos utilizados para o VEEV são recomendados para a confirmação laboratorial da infecção pelo WEEV.

6.3.4 Controle e profilaxia

A vacinação de eqüinos com uma vacina multivalente inativada (VEEV, EEEV e WEEV) constitui-se na base dos programas de controle em áreas endêmicas. A vacinação é, geralmente, realizada antes do verão, em duas doses, com intervalo de 14 a 21 dias, seguidas de revacinações anuais. Em áreas de atividade de vetores durante o ano inteiro, os potros devem ser vacinados aos 3-6 meses de idade e revacinados anualmente. Não há vacinas disponíveis de uso humano. Medidas de controle/prevenção em áreas endêmicas incluem a prevenção à exposição aos vetores e/ou uso de repelentes. A maior atividade dos vetores ocorre no crepúsculo e durante a noite.

7 Bibliografia consultada

- BRUNO-LOBO, G.; BRUNO-LOBO, M.; TRAVASSOS, J.; PINHEIRO, F.; PAZIN, I. P. Estudos sobre arbovírus. III. Isolamento de vírus sorologicamente relacionado ao sub-grupo Weaster – Sindbis de um caso de encefalomielite eqüina no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.* v.9, pt.A, p. 183-1, 1961.
- CALISHER, C. H.; KINNEY, R. M.; DE SOUZA LOPES, O.; TRENT, D. W.; MONATH, T. H.; FRANCY, D. B. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.31, n. 6, p. 1260-1272, Nov. 1982.
- FARRAR, M.D.; MILLER, D.L.; BALDWIN, C.A.; STIVER, S.L.; HALL, C.L. Eastern equine encephalitis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* v. 17, n. 6, p. 614-617, 2005.
- FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; ROCCO, I. M.; MARTI, A. T.; SOUZA, L. T. M.; IVERSSON, L. B. Surveillance of arbovirus infections in the atlantic forest region, state of São Paulo, Brazil. I:

- Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1987 and 1990. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.36, p. 265-274, 1994.
- FERNANDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; SOCCOL, V. T. Identification of the encephalitis equine virus, Parana, Brazil. **Rev. Saude Publica.** v. 34, n.3, p. 232-235, jun. 2000.
- IVERSSON, L. B.; SILVA, M. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; BARROS, R. S. V. Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 35, p. 355-359, 1993.
- JOHNSON, K. M.; MARTIN, D. H. Venezuelan Equine Encephalitis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.** v.18, p. 79-116, 1974.
- JOHNSTON, ROBERT E.; PETERS, C. J. Alphaviruses. In: **Fields virology**, third edition. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. Lippincott: Raven, 1996.
- KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. eds. **Fields' virology**. 4th. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- MURPHY, FREDERICK A.; GIBBS E. P. J.; HORZINEK, MARIAN C.; STUDDERT, MICHAEL J. Togaviridae. In: **Veterinary virology**. 3th. ed., 1999.
- NAVARRO, JUAN-CARLOS; MEDINA, GLADYS; VASQUEZ, CLOVIS; COFFEY, LARK L.; WANG, ERYU; SUÁREZ, ALEXANDER; BORD, HERNÁN; SALAS, MARLENE; WEAVER, SCOTT C. Postepizootic Persistence of Venezuelan Equine Encephalitis Virus, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases.** www.cdc.gov/eid . v. 11, n. 12, Dec. 2005.
- RICHARTZ R. R. T. Detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação para Alphavírus em soro de eqüinos do estado do Paraná [dissertação]. Curitiba(PR): **Universidade Federal do Paraná**; 1994.
- RICO-HESSER, R.; WEAVER, S. C.; DE SIGER, J.; MEDINA, G.; SALAS, R. A. Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1995. 92:5278-81.
- RIVAS, F.; DIAZ, L. A.; CARDENAS, V. M.; DAZA, E.; BRUZON, L.; ALCALA, A. et al. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. **J. Infect. Dis.** 1997; 175:828-32.
- ROMANO-LIEBER, N. S.; IVERSSON, L. B. Serological survey on arbovirus infection in residents of an ecological reserve. **Rev. Saude Pública.** 2000 Jun; 34(3):236-42.
- SCHLESINGER, SONDRÁ; SCHLESINGER J. MILTON. Togaviridae: The Viruses and Their Replication. In: **Fundamental Virology**, Third Edition edited by B. N. Fields; D. M. Knipe; P. M. Howley, et al. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia 1996.
- WALDER, R.; SUAREZ, O.M.; CALISHER C. H. Arbovirus studies in the Guajira region of Venezuela: activities of Eastern equine encephalitis and Venezuelan equine encephalitis viruses during an interepizootic period. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1984; 33: 699-707.
- WALTON, T. E.; ALVAREZ O. Jr.; BUCKWALTER, R. M.; JOHNSON, K. M. 1973. Experimental infection of horses with enzootic and epizootic strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. **J. Infect. Dis.** 128:271-82.
- WANG, E.; BOWEN, R. A.; MEDINA, G.; POWERS, A. M.; KANG, W; et al. 2001. Virulence and viremia characteristics of 1992 epizootic subtype IC Venezuelan equine encephalitis viruses and closely related enzootic subtype ID strains. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65:64-69.
- WEAVER, S.C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. **Arch. Virol. Suppl.** 2005: 19:33-44.
- WEAVER, SCOTT C.; FERRO, CRISTINA; BARRERA, ROBERTO; BOSHELL, JORGE; NAVARRO, JUAN-CARLOS. Venezuelan Equine Encephalitis. **Annu. Ver. Entomol.** 2004. 49:141-74.
- WEAVER, S. C.; PFEFFER, M.; MARRIOTT, K.; KANG W.; KINNEY, R. M. Genetic evidence for the origins of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB outbreaks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1999; 60:441-8.

1 Introdução	615
2 Classificação	615
3 Estrutura do vírion e do genoma	615
4 Replicação	618
5 Coronavírus de interesse veterinário	620
5.1 Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos	620
5.1.1 Epidemiologia	621
5.1.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos	621
5.1.3 Imunidade	622
5.1.4 Diagnóstico	622
5.1.5 Prevenção e controle	623
5.2 Coronavírus respiratório dos suínos	623
5.3 Vírus da diarreia epidêmica dos suínos	623
5.4 Vírus da encefalomielite hemaglutinante dos suínos	623
5.5 Coronavírus felino e vírus da peritonite infecciosa dos felinos	624
5.5.1 Epidemiologia	624
5.5.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos	625
5.5.3 Imunidade	625
5.5.4 Diagnóstico	626
5.5.5 Prevenção e controle	626
5.6 Coronavírus canino	626
5.6.1 Epidemiologia	627
5.6.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos	627
5.6.3 Imunidade	628
5.6.4 Diagnóstico	628
5.6.5 Prevenção e controle	628
5.7 Coronavírus canino respiratório	629

5.8 Coronavírus bovino	629
5.8.1 Epidemiologia	630
5.8.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos	630
5.8.3 Imunidade	631
5.8.4 Diagnóstico	631
5.8.5 Prevenção e controle	631
5.9 Vírus da bronquite infecciosa das galinhas	632
5.9.1 Epidemiologia	632
5.9.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos	632
5.9.3 Imunidade	633
5.9.4 Diagnóstico	634
5.9.5 Prevenção e controle	634
5.10 Coronavírus dos perus	634
6 Torovírus de interesse veterinário	635
6.1 Vírus Berne eqüino	635
6.2 Vírus Breda bovino	635
7 Coronavírus humanos	636
8 Bibliografia consultada	636

1 Introdução

A família *Coronaviridae* possui dois gêneros: o *Coronavirus* e o *Torovirus*. Os *Coronavirus* são vírus RNA envelopados, possuem o maior genoma conhecido entre os vírus RNA e estão envolvidos principalmente em doenças respiratórias e digestivas de animais e humanos. Em algumas enfermidades específicas, outras manifestações, como a poliserosite, miocardite, hepatite, encefalomielite, nefrite e imunopatologias, podem estar associadas com patógenos desse gênero. O envelope desses vírus apresenta longas espículas que dão à partícula viral um aspecto típico de coroa, derivando daí o nome da família. Outro aspecto importante desses vírus é o complexo mecanismo de replicação viral, que inclui a produção de RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos. Essa forma complexa de replicação resulta em uma alta frequência de recombinações. Por essa razão, muitos desses vírus apresentam uma grande variação antigênica, com a existência de vários sorotipos circulantes.

Importantes doenças víricas de animais domésticos, como a bronquite infecciosa das galinhas, a gastroenterite transmissível dos suínos e a peritonite infecciosa dos felinos têm como agente etiológico algum dos coronavírus. O interesse por essa família aumentou recentemente devido à classificação de um novo coronavírus humano, o vírus da pneumonia asiática (SARS-COV). Os coronavírus humanos conhecidos antes do aparecimento do vírus da SARS eram pouco patogênicos e, principalmente, envolvidos em resfriados comuns. No gênero *Torovirus*, estão classificados apenas dois vírus que causam doença em animais. Os patógenos animais desse gênero causam diarreia, sendo que o vírus Berne (BEV) infecta eqüinos e o vírus Breda (BRV) infecta bovinos. Neste capítulo, serão discutidos alguns aspectos gerais da família *Coronaviridae* e das doenças de interesse veterinário com ênfase para os vírus do gênero *Coronavirus*. Alguns tópicos específicos abordados para os vírus do gênero *Torovirus* serão mencionados no texto.

2 Classificação

Os vírus da família *Coronaviridae* estão classificados na ordem *Nidovirales*, juntamente com as famílias *Arteriviridae* e *Roniviridae*. Esses vírus apresentam diferenças morfológicas, mas são agrupados nessa ordem por possuírem uma estratégia única e comum de replicação. A expressão gênica desses vírus ocorre pela transcrição de vários mRNAs subgenômicos, sintetizados a partir de um RNA intermediário de polaridade negativa.

Os coronavírus são subdivididos em três grupos (grupos I, II e III), de acordo com a sua reatividade sorológica. Dentro desses grupos, os vírus são classificados de acordo com o seu hospedeiro natural, com a sequência de nucleotídeos e relações sorológicas. Na Tabela 24.1, são apresentados os vírus que compõem os gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*.

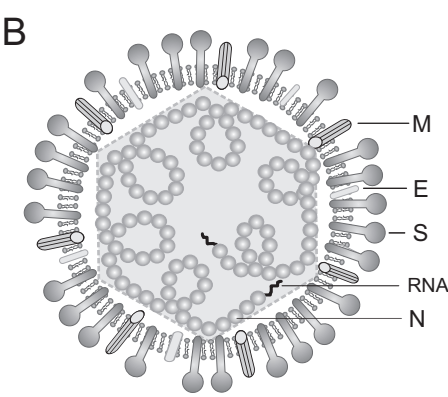
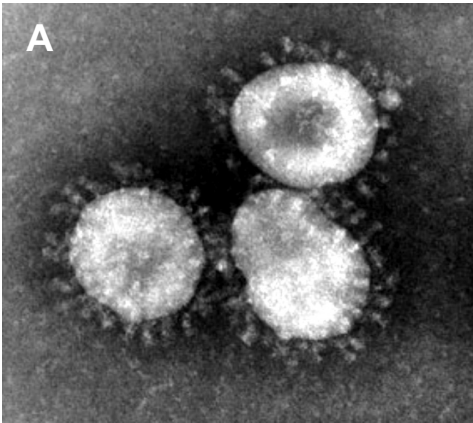
3 Estrutura do vírion e do genoma

Os coronavírus possuem vírions envelopados e pleomórficos cujo diâmetro pode variar de 80 a 120 nm, apresentando um diâmetro médio de 100 nm. A aparência desses vírus, quando observados na microscopia eletrônica (ME), deu origem ao nome da família. Os vírions possuem geralmente uma forma esférica, com o envelope circundado por peplômeros ou projeções externas de aproximadamente 20 nm de extensão, que conferem à partícula uma aparência similar a uma coroa. Essas projeções externas são formadas pelas glicoproteínas S da superfície do envelope viral. Na Figura 24.1, apresenta-se uma foto de ME e um esquema da estrutura dos vírions da família *Coronaviridae*.

A glicoproteína S apresenta uma massa molecular entre 150 e 180 kd e possui três domínios; um domínio externo maior, que, em algumas espécies, é dividido em dois domínios (S1 e S2); um domínio transmembrana e um pequeno domínio interno. Essa glicoproteína é responsável pela ligação dos vírions aos receptores celulares, induz

Tabela 24.1. Classificação dos coronavírus em grupos de acordo com a reatividade sorológica.

Grupo antigênico		Vírus	Hospedeiro	Doença
Coronavirus	I	TGEV	Suíno	Gastroenterite
		PRCoV	Suíno	Respiratória, subclínica
		PEDV	Suíno	Gastroenterite
		FIPV	Gatos	Peritonite
		FCoV	Gatos	Enterite, assintomática
		CCoV	Cães	Enterite
	II	HCoV-229E	Humanos	Resfriado comum
		HEV	Suíno	Encefalite, definhamento
		BCoV	Bovino	Gastroenterite
		TCoV	Perus	Enterite
		MHV	Camundongos	Hepatite
		HCoV-OC43	Humanos	Resfriado comum
	III	IBV	Galinhas	Traqueobronquite, nefrite
Torovirus		BToV	Bovinos	Subclínica
		BRV	Bovinos	Gastroenterite
		EToV	Eqüinos	Subclínica
		BEV	Eqüinos	Gastroenterite
		HToV	Humanos	Gastroenterite
		PToV	Suínos	Subclínica



Fonte: A) PHIL Library, CDC.

Figura 24.1. Vírions da família *Coronaviridae*. A) Microscopia eletrônica de vírions do SARS-Co B) Ilustração esquemática de um vírion com os seus componentes. M: proteína de membrana; E, S: glicoproteínas do envelope; N: nucleoproteína; RNA: genoma.

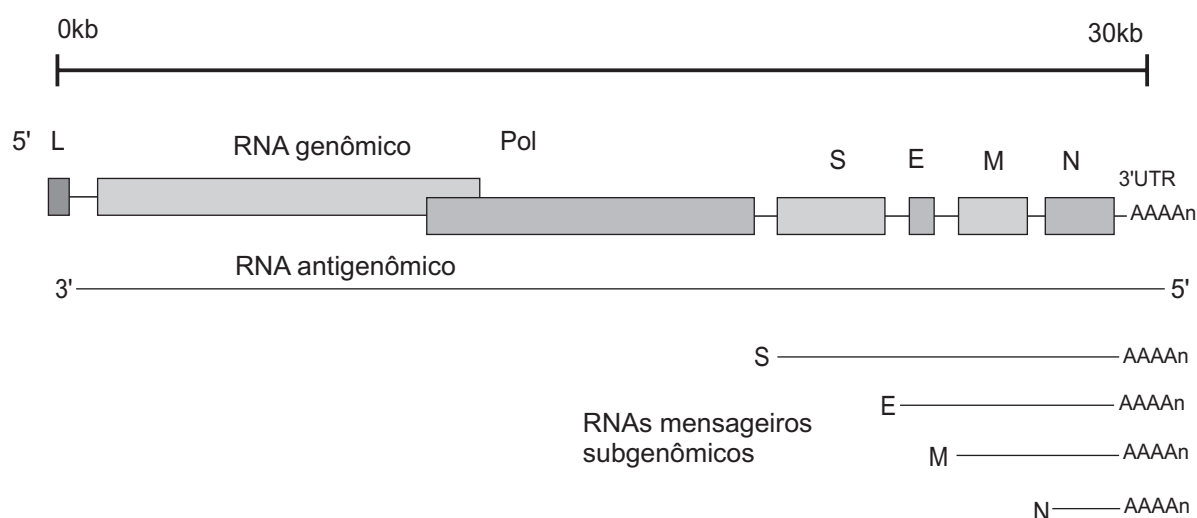
a fusão do envelope com a membrana plasmática e apresenta importantes sítios antigênicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes e induzem a resposta imune celular.

No envelope, também estão presentes várias cópias da proteína M, que é uma proteína de membrana que possui um pequeno domínio externo, um domínio com três passagens através da membrana e um grande domínio interno. A proteína M interage com o nucleocapsídeo, atua na morfogênese e brotamento dos vírions e forma o revestimento do núcleo (*core*) do vírion. Recentemente foi identificada outra pequena proteína do envelope, que também parece estar envolvida na morfogênese dos vírions no final da replicação, denominada proteína E, sobre a qual pouca informação está disponível.

Alguns coronavírus apresentam ainda a proteína hemaglutinina-esterase (HE). A HE possui atividade de acetilesterase e é responsável pela clivagem do ácido siálico. Essa proteína parece não ser essencial para a replicação dos vírus, mesmo naqueles que a possuem na sua superfície. Por outro lado, a presença da HE pode influenciar a patogenicidade dos vírus em animais. A HE induz hemaglutinação e hemadsorção e, provavelmente, contribui nos processos de penetração e liberação do vírus das células infectadas.

O genoma dos coronavírus é uma molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva. O RNA genômico pode ter de 27 a 32 kb, sendo o maior genoma entre os vírus RNA. A extremidade 5' do genoma possui uma estrutura *cap* e a extremidade 3' é poliadenilada, como ocorre nos mRNA celulares. Nas proximidades da região 5' do genoma se localiza uma sequência de 65 a 98 nucleotídeos denominada *líder*, seguida de uma sequência de 200 a 400 nt, que não é traduzida. Próxima à extremidade 3' e imediatamente anterior à região poliadenilada está presente uma região não-traduzida (UTR) de 200 a 500 nt. A estrutura e organização do genoma dos coronavírus está ilustrada esquematicamente na Figura 24.2.

As proteínas virais não-estruturais são codificadas na região mais próxima da extremidade 5' do genoma, enquanto as proteínas estruturais são codificadas próximas à extremidade 3'. Os dois terços iniciais do genoma correspondem ao gene L e codificam a polimerase viral (polimerase de RNA dependente de RNA – replicase). Essa região possui duas sequências abertas de leitura (ORFs) sobrepostas, que são traduzidas em uma poliproteína no início do ciclo replicativo. Em todos os coronavírus, a sequência de genes no genoma é 5' Pol – S – E – M – N 3'. Entre esses genes



(Fonte: adaptada de Knipe et al. (2001))

Figura 24.2. Ilustração esquemática do genoma dos coronavírus. L) líder; Pol) gene da replicase; S) gene da glicoproteína; E) gene da glicoproteína; M) gene da proteína de membrana; N) gene da proteína do nucleocapsídeo. O RNA de sentido antigenômico e os mRNAs subgenômicos produzidos durante o ciclo replicativo estão ilustrados abaixo. A proteína traduzida a partir de cada um desses mRNAs está indicada.

podem ser encontradas outras ORFs que codificam algumas proteínas não-estruturais e também a proteína HE. A presença dessas ORFs, a sua extensão, a forma de expressão e a distribuição podem variar entre os coronavírus.

O genoma dos coronavírus está associado com múltiplas cópias de uma fosfoproteína viral (N), formando um nucleocapsídeo helicoidal. A proteína N possui um domínio de associação ao RNA que facilita sua ligação ao genoma viral. Essa proteína associa-se também à proteína M no processo de morfogênese das partículas virais. Em alguns vírus, foi demonstrado que o nucleocapsídeo helicoidal está envolvido por uma estrutura interna de, aproximadamente, 65 nm de diâmetro, que possui uma forma aparentemente esférica, possivelmente icosaédrica (Figura 24.1).

Os coronavírus, a exemplo de outros vírus RNA, sofrem mutações freqüentes no seu genoma em função dos erros cometidos pela RNA polimerase. Vários mutantes *ts* (sensíveis à temperatura) do vírus da hepatite dos camundongos (MHV) já foram identificados. Além disso, alguns coronavírus que causam doenças em animais foram originados a partir de deleções no genoma de vírus preexistentes. Este é o caso do coronavírus respiratório dos suínos (PRCoV), que se originou a partir do TGEV por uma deleção no gene que codifica a proteína S. O surgimento de cepas mais virulentas do coronavírus felino entérico (FCoV), responsáveis pela peritonite infecciosa felina (FIP), também parece estar relacionado com deleções do genoma.

A alta freqüência de recombinação é outro aspecto importante na genética dos coronavírus que pode ter reflexos importantes na patogenia e na epidemiologia desses vírus. Embora os coronavírus não possuam um genoma segmentado, a alta freqüência de recombinação provavelmente possa ser explicada pela complexidade da replicação, envolvendo etapas de transcrição descontínua. O mecanismo de recombinação entre cepas de campo já deu origem a diferentes subtipos do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) e alguns isolados de FCoV parecem ter se originado da recombinação entre o vírus felino e o CCoV. Uma freqüência de recombinação de 25% para todo o genoma foi observada no MHV, um dos coronavírus mais estudados.

Os vírions dos coronavírus são facilmente inativados por solventes lipídicos, agentes oxidantes, formaldeído, detergentes e desinfetantes comuns. Os vírions das diferentes espécies de coronavírus apresentam também uma grande sensibilidade ao calor e estabilidade ao pH ácido, e alguns são estáveis a pH 3.0. Os vírions possuem uma massa molecular de aproximadamente 400×10^6 , densidade Buoyant de $1.15 - 1.19 \text{ g/cm}^3$ em sucrose e $1.23 - 1.24 \text{ g/cm}^3$ em CsCl.

4 Replicação

A primeira etapa da replicação dos coronavírus é a ligação dos vírions, pela glicoproteína S, aos receptores na membrana celular. Esses receptores já foram identificados para alguns coronavírus, mas ainda são desconhecidos para outros. Os vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV), da peritonite infecciosa felina (FIPV) e, provavelmente, o coronavírus canino (CCoV) utilizam a aminopeptidase N como receptor. A aminopeptidase N é uma metaloprotease associada à membrana plasmática. Alguns vírus, como o coronavírus bovino (BCoV), que possuem a proteína HE no envelope, podem, ainda, utilizar o ácido siálico como receptor.

A penetração dos vírions na célula hospedeira pode ocorrer por duas vias possíveis. Pode ocorrer após endocitose, pela fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica na presença de um pH ácido para alguns coronavírus (Figura 24.3). Outros coronavírus não necessitam do pH baixo para a fusão e, nesses casos, a penetração ocorre pela fusão do envelope com a membrana plasmática na superfície da célula. O desnudamento do genoma ocorre logo após a penetração e envolve mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Provavelmente necessita da participação de fatores celulares.

Assim que o genoma é liberado no citoplasma, o gene 1 (pol) é traduzido em uma poliproteína, para a produção da replicase viral e outras enzimas envolvidas com a replicação do RNA. Apesar dos coronavírus possuírem um genoma de sentido positivo que serve como mRNA, os demais genes não são sintetizados pela tradução direta do RNA genômico. A polimerase viral re-

cém-sintetizada utiliza o RNA genômico como modelo para fazer uma cópia de RNA intermediário de sentido negativo. A partir deste RNA negativo serão produzidas cópias de RNA de extensão genômica – que serão, posteriormente, incluídas nas partículas virais – e cópias de mRNA subgenômicos, que serão traduzidos nas demais proteínas estruturais e não-estruturais necessárias para a produção da progênie viral.

O número de mRNA subgenômicos pode variar de cinco a sete, dependendo do vírus. A extensão desses mRNA também é variável. Apenas a ORF mais próxima da extremidade 5' é tradu-

zida, embora alguns mRNA possuam duas ou três ORFs. Na extremidade 5' de todos os mRNA subgenômicos, encontra-se a sequência líder, que é idêntica à sequência que é encontrada na extremidade 5' do RNA genômico. A sequência líder apresenta, na sua extremidade 3', uma sequência de 7 a 18 nt, homóloga a uma sequência encontrada entre os genes do RNA genômico, denominada sequência intergênica ou sequência associada à transcrição (TAS). A TAS do vírus da hepatite murina (MHV) possui a sequência UCUAAAC e a extremidade 3' da sequência líder desse vírus consiste em várias repetições da sequência UCUAA.

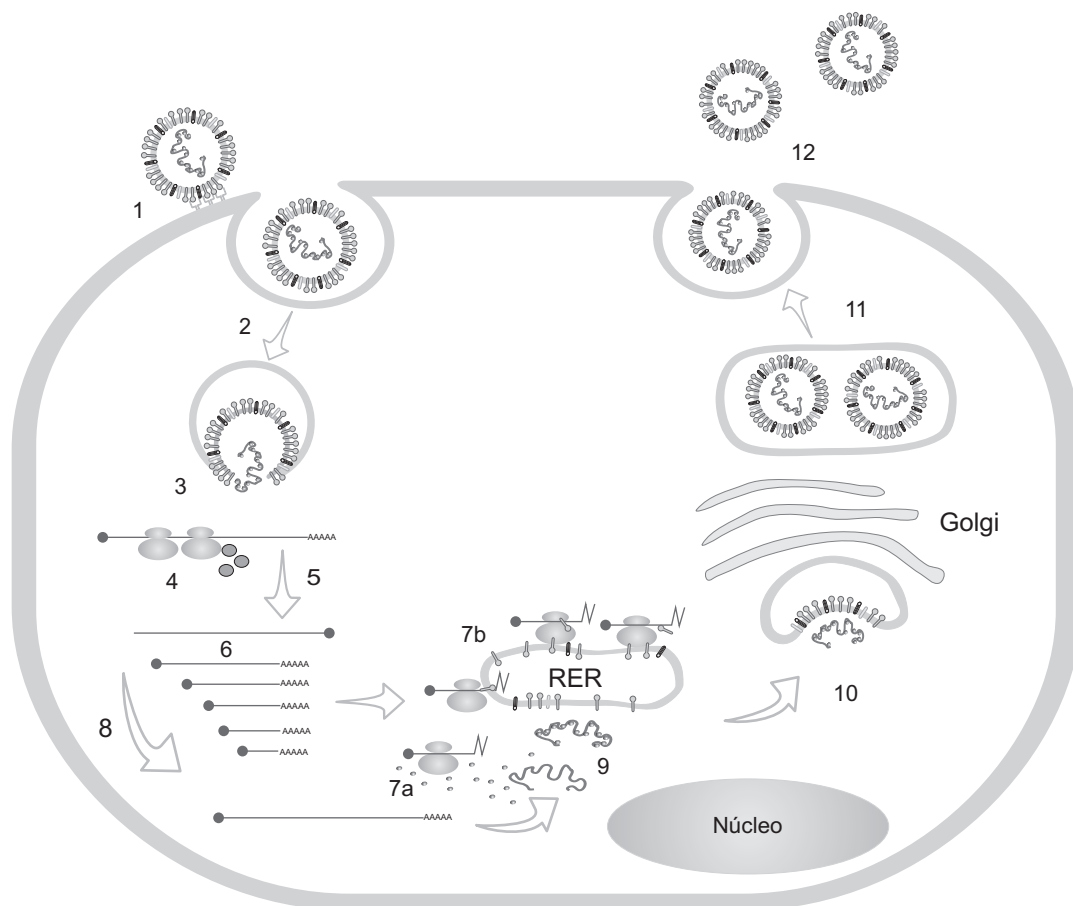


Figura 24.3. Ilustração simplificada do ciclo replicativo dos coronavírus. 1) Ligação aos receptores celulares; 2) Internalização por endocitose (nem todos); 3) Penetração por fusão do envelope com a membrana endocítica; 4) Tradução da região 5' do genoma e produção da polimerase; 5) Síntese da cópia antígenômica; 6) Síntese dos mRNAs subgenômicos; 7a e 7b) Tradução dos mRNAs subgenômicos nas proteínas estruturais; 8) Síntese do RNA genômico; 9) Conjugação do RNA genômico com proteínas do nucleocapsídeo; 10) Brotamento do nucleocapsídeo no RER ou Golgi; 11) Transporte da progênie viral em vesículas até a membrana plasmática; 12) Egresso por exocitose.

O mecanismo da síntese dos mRNA subgenômicos ainda não foi esclarecido, mas há três hipóteses para explicá-lo. A primeira hipótese denomina-se “transcrição iniciada pela sequência líder”. Nesse caso, ocorreria inicialmente a transcrição da sequência líder a partir da cópia negativa do RNA. Este transcrito se ligaria a qualquer sequência intergênica e serviria como *primer* ou iniciador para a transcrição do mRNA a partir dessa sequência intergênica.

Outra hipótese seria a “transcrição descontínua durante a síntese do RNA de cadeia negativa”. Nesse modelo, a polimerase que está sintetizando a cópia de RNA negativa a partir do RNA genômico faria uma parada em uma sequência intergênica e, em seguida, saltaria para a extremidade 3' da sequência líder do RNA genômico copiando esta região. Esse processo resultaria na produção de um mRNA subgenômico negativo que serviria de modelo para cópias de RNA positivo.

Evidências experimentais suportam essas duas hipóteses. Uma terceira hipótese também tem sido descrita, embora seja menos provável, na qual mRNA subgenômicos seriam incorporados ao vírion juntamente com o RNA genômico. Assim, os mRNA trazidos nos vírions serviriam de modelo para a síntese de cópias negativas, que seriam, então, copiadas em novos mRNAs.

A tradução dos mRNA subgenômicos ocorre em ribossomos associados à membrana dos retículos endoplasmáticos (RE) ou livres no citoplasma. Após a tradução, as proteínas são processadas de acordo com sua finalidade, podendo ser fosforiladas, glicosiladas e/ou clivadas. A tradução das proteínas estruturais S, M e HE é realizada por ribossomos na membrana do RE. Essas proteínas são, posteriormente, glicosiladas e a proteína S é clivada em S1 e S2 em alguns coronavírus. A proteína N é traduzida por ribossomos livres no citoplasma e é fosforilada em seguida. A proteína E passa por um processo de acilação e localiza-se na região perinuclear de células infectadas.

A replicação do RNA ocorre em complexos de replicação associados com membranas intracitoplasmáticas. Aparentemente, esses complexos são formados pelas proteínas virais e, possivel-

mente, por proteínas celulares associadas. Inicialmente acreditava-se que a replicação do RNA genômico deveria ocorrer de forma contínua, utilizando um RNA de cadeia negativa completo como modelo, em oposição aos mRNA subgenômicos produzidos na transcrição. Contudo, evidências recentes demonstram que a síntese do RNA genômico também parece ocorrer de forma descontínua, envolvendo uma sequência líder.

A morfogênese dos vírions inicia-se com a associação de múltiplas cópias da proteína N com o genoma viral e a formação do nucleocapsídeo helicoidal. Em seguida, o nucleocapsídeo interage com a proteína M nas membranas do RE ou no complexo de Golgi, levando à formação do envoltório interno do nucleocapsídeo e ao seu empacotamento nas partículas que brotarão para o interior desses compartimentos. Para a formação da partícula viral, a proteína E atua em conjunto com a proteína M. Os vírions brotam a partir de uma estrutura especializada de membrana, localizada entre o RE e o complexo de Golgi. Os coronavírus se acumulam em vesículas, que são transportadas até a membrana plasmática, e são liberados por exocitose. Todas as etapas do ciclo replicativo ocorrem no citoplasma. O ciclo replicativo dos coronavírus está representado esquematicamente na Figura 24.3.

5 Coronavírus de interesse veterinário

A seguir, serão abordadas as principais coronaviroses de animais, de acordo com a espécie afetada.

5.1 Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos

O TGEV produz uma doença entérica altamente contagiosa em leitões, descrita pela primeira vez, nos Estados Unidos, em 1946. Esse vírus pertence ao grupo I dos coronavírus e apenas um sorotipo do vírus foi identificado até o presente. O vírus apresenta relação antigênica com o coronavírus canino (CCoV), vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), coronavírus entérico felino (FCoV), coronavírus humano (HCoV), vírus

da diarreia epidêmica dos suínos (PEDV) e com o coronavírus respiratório dos suínos (PRCOV).

Essas relações antigênicas resultam em reações sorológicas cruzadas entre os vírus. No entanto, apesar da semelhança antigênica, foram observadas várias diferenças na biologia dos vírus, tanto *in vitro* como *in vivo*. O CCoV e o TGEV replicam em células de origem canina e felina, entretanto o CCoV e o FIPV não replicam em células suínas, nas quais o TGEV replica. A infecção experimental de leitões com o FIPV resultou em diarreia e lesões intestinais típicas de TGE, mas a infecção de leitões com o CCoV não provocou manifestações na maioria dos casos, tendo sido observado apenas uma atrofia leve das vilosidades de alguns animais.

A partícula viral do TGEV difere um pouco dos demais coronavírus porque apresenta uma estrutura de núcleo (*core*) interno de aproximadamente 65 nm, envolvendo o nucleocapsídeo helicoidal. A forma dessa estrutura não é bem definida, mas, aparentemente, é icosaédrica. No genoma do TGEV, além dos genes descritos anteriormente, estão presentes outros três genes que codificam proteínas não-estruturais. Dois desses genes são denominados 3a e 3b e estão localizados entre os genes das proteínas S e M. O outro gene recebeu o número sete e localiza-se entre o gene da proteína N e a região 3'UTR.

5.1.1 Epidemiologia

A TGE é uma doença prevalente no Hemisfério Norte, principalmente em áreas de produção suína intensiva dos Estados Unidos e em alguns países da Europa. Nessas regiões, a doença ocorre de forma sazonal durante o inverno, o que é atribuído à alta estabilidade do vírus em baixas temperaturas e à incidência solar reduzida. No Brasil, já houve o registro de ocorrência da doença, mas esta não é comumente encontrada na população suína brasileira.

Nos últimos anos, foi observada uma redução na incidência da TGE em países europeus, e os pesquisadores estão atribuindo essa redução à circulação endêmica do PRCOV na população suína. Os animais que entram em contato com o

PCRV desenvolveriam imunidade cruzada contra o TGEV. De fato, experimentos realizados com a inoculação do PRCOV e posterior desafio com o TGEV demonstraram que pode haver proteção cruzada entre esses vírus.

O TGEV é transmitido principalmente pela via fecal-oral, pelo contato direto entre animais ou pela contaminação da ração, utensílios, veículos ou pessoas. A transmissão por aerossóis ou por meio de pássaros contaminados também deve ser considerada. Ainda não está claro como o vírus é mantido durante as estações quentes, mas a ocorrência de infecções subclínicas em algumas propriedades (na forma endêmica da doença), a existência de outros hospedeiros e a existência do estado de portador na espécie suína têm sido consideradas.

5.1.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos

A patogenia da TGE é típica dos coronavírus entéricos, cuja replicação restringe-se ao trato digestivo. O TGEV penetra pela via oral e é conduzido até o intestino delgado (ID), resistindo ao pH baixo e às enzimas proteolíticas do trato digestivo. O vírus replica nas células epiteliais das vilosidades do ID, provocando distúrbios funcionais e destruição dessas células. Esses distúrbios resultam na redução da atividade enzimática no ID, na interrupção dos processos digestivos normais e no transporte de nutrientes e eletrólitos. Esses aspectos caracterizam a síndrome da má-absorção que ocorre na doença. Ocorre também uma alteração no transporte de sódio no jejuno, tendo como consequência o acúmulo de líquido e eletrólitos no lúmen intestinal, o que contribui para a produção da diarreia. Outra disfunção observada é o extravasamento de proteínas plasmáticas. A desidratação e acidose metabólica são as mais prováveis causas da morte. A principal lesão observada no intestino é o achatamento ou atrofia das vilosidades, que é evidente particularmente no jejuno, mas pode estar presente também no íleo e, com menor frequência, no duodeno.

A TGE pode se manifestar nas formas epidêmica e endêmica. A forma epidêmica é mais

frequentemente observada e caracteriza-se pela propagação muito rápida da doença na propriedade, com alta mortalidade de leitões de até duas semanas de idade. Isso contrasta com os sinais leves e sem mortalidade observados em animais adultos. Os animais apresentam anorexia, letargia, diarreia, perda de peso e vômito. A infecção em neonatos resulta em rápida desidratação e a taxa de mortalidade é de aproximadamente 100%. Essa taxa é reduzida com o aumento da idade dos leitões, até as duas semanas. As fêmeas em lactação podem apresentar febre, anorexia, agalaxia, diarreia e vômito, que pode estar associada com o contato com a prole infectada ou também com aspectos endócrinos específicos da fase de lactação. Essa forma da doença geralmente se resolve em duas a três semanas na propriedade.

A forma endêmica da doença é menos frequente e se manifesta com sinais clínicos semelhantes, porém mais brandos do que os observados na forma epidêmica. Essa forma ocorre em propriedades em que a infecção é mantida pela introdução contínua de animais susceptíveis. A taxa de mortalidade é baixa, atingindo 10 a 20% dos animais. Nesse caso, os leitões geralmente apresentam a doença entre os seis dias de idade até duas semanas após o desmame. As fêmeas lactantes não apresentam sinais clínicos e transferem imunidade aos leitões.

5.1.3 Imunidade

Anticorpos contra o TGEV podem ser detectados no soro aos 14 dias após a infecção, persistindo por seis meses e, possivelmente, até por anos. Anticorpos das classes IgM, IgG e IgA estão presentes. Os animais que se recuperam são considerados protegidos contra o vírus, entretanto, em alguns casos, essa proteção pode ser incompleta.

A proteção parece estar relacionada com a presença de IgA no lúmen intestinal, o que foi comprovado pela observação de que leitões nascidos algumas semanas após um surto de TGE não eram afetados pelo vírus. Essa proteção seria conferida pelo contínuo suprimento de IgA no colostro e no leite de fêmeas que sofreram a infecção recentemente. Estudos posteriores com-

provaram que a neutralização do vírus ocorre no lúmen do intestino pelos anticorpos adquiridos pela ingestão de colostro ou leite, evitando assim a infecção das células epiteliais. Essa forma de imunidade foi denominada “imunidade lactogênica”. A presença de IgG sistêmica parece não ter papel importante na proteção contra a doença.

A resposta imune celular provavelmente desempenhe um papel importante na imunidade ativa contra o TGEV. Apesar dos diversos estudos, o papel dos linfócitos T-auxiliares (Th) e citotóxicos (Tc) foi pouco esclarecido. O envolvimento de linfócitos Th na indução da proliferação de linfócitos B e síntese de anticorpos foi sugerido pela identificação de três epitopos para essas células na proteína viral N. Por outro lado, observou-se um aumento no número de células NK e Tc em leitões infectados com o TGEV, sugerindo a sua participação na resposta imune contra esse vírus. Evidências da participação da imunidade celular através de linfócitos Th, Tc e células NK foram também observadas em testes de uma vacina que possui um vetor baculovírus que expressa as proteínas S, N e M do TGEV.

5.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo deve basear-se nas manifestações clínicas e nos aspectos epidemiológicos da doença. O diagnóstico definitivo necessita a realização de testes laboratoriais de detecção de vírus ou de antígenos virais. A imunofluorescência (IFA), realizada em cortes de criostato ou em esfregaços de mucosa intestinal, é a técnica mais usual de diagnóstico. A imunoperoxidase (IPX) também tem sido utilizada em alguns casos. O isolamento do vírus geralmente é um processo demorado e, muitas vezes, infrutífero, mas pode ser realizado em células de tireóide ou de testículos suínos, nas quais a replicação viral resulta na produção de efeito citopático. A detecção de antígenos virais nas fezes também pode ser realizada pelo uso de um ensaio imunoenzimático (ELISA). A microscopia eletrônica (ME) não é recomendada para a detecção do TGEV, porque não há como diferenciá-lo do PEDV. A sorologia pareada (coleta de duas amostras de soro, uma no início da infecção e outra 14 dias após) tam-

bém pode ser um auxílio ao diagnóstico. A detecção de anticorpos pode ser feita pelas técnicas de soroneutralização (SN) e ELISA.

5.1.5 Prevenção e controle

O controle da doença deve enfatizar principalmente a prevenção da introdução do agente na propriedade. Isso pode ser obtido pela adoção de medidas como: adquirir animais somente de fontes sabidamente negativas e evitar a introdução de material, equipamento ou pessoal proveniente de propriedades com a doença. Existem algumas vacinas contendo o vírus atenuado ou inativado disponíveis no comércio de outros países. O esquema mais utilizado nas regiões que apresentam a infecção é a vacinação das porcas prenhes com a vacina atenuada algumas semanas antes do parto. No entanto, as vacinas utilizadas até o presente têm sido pouco efetivas na prevenção da doença. Vacinas de subunidades e vacinas recombinantes em vetores virais estão em fase de pesquisa e desenvolvimento.

Uma medida considerada efetiva para o controle é a exposição de porcas prenhes algumas semanas antes do parto ao vírus encontrado nas fezes de animais infectados. Esse procedimento é conhecido como “infecção controlada” e consiste na introdução oral de fezes ou porções intestinais de animais infectados nas porcas. Essa prática, quando aplicada, deve possuir o acompanhamento de um médico veterinário.

5.2 Coronavírus respiratório dos suínos

O coronavírus respiratório dos suínos (PRCoV) foi inicialmente identificado em granjas que não apresentavam histórico clínico de TGE, mas os suínos testados apresentaram sorologia positiva para o TGEV. O PRCoV apresenta aproximadamente 96% de homologia com o TGEV e também pertence ao grupo I dos coronavírus. Essas características explicam a reação sorológica cruzada entre esses vírus. Aparentemente, o PRCoV evoluiu a partir do TGEV, por deleções na região que codifica a glicoproteína S. O PRCoV apresenta tropismo por células do sistema respiratório, replicando nesses tecidos com

grande eficiência. Atualmente o vírus é endêmico na Europa e em algumas regiões dos Estados Unidos. Na grande maioria dos casos, os animais são infectados e ocorre soroconversão logo após o desmame. Em condições experimentais, a inoculação do vírus em leitões que não receberam o colostro reproduziu a doença respiratória; no entanto, a infecção a campo parece ser geralmente subclínica. O vírus se propaga através de aerossóis e pode percorrer longas distâncias quando transportado pelo vento. O controle da infecção é muito difícil pela sua facilidade de propagação e contágio, e não existem vacinas disponíveis. Como a infecção por esse vírus não representa um grande problema sanitário e econômico, não existem maiores preocupações com o desenvolvimento de vacinas ou com o seu controle.

5.3 Vírus da diarreia epidêmica dos suínos

A diarreia epidêmica dos suínos é uma doença clinicamente semelhante à TGE, e os animais infectados apresentam uma diarreia aquosa como a principal manifestação clínica. Esta doença tem sido descrita apenas na Europa e em alguns países da Ásia. Existe só um sorotipo do PEDV, incluído no grupo I dos coronavírus, que não apresenta relação antigênica com os demais coronavírus suínos ou de outras espécies. A única relação antigênica detectada até o presente foi com a proteína do nucleocapsídeo do FIPV. Animais de todas as idades podem desenvolver a doença, e a taxa de mortalidade pode atingir até 50% em neonatos e em leitões com idade inferior a três semanas. No entanto, em alguns casos, pode chegar a 80%. A taxa de mortalidade mais baixa e a lenta propagação da doença no rebanho (semanas) são consideradas as principais diferenças epidemiológicas entre essa doença e a TGE. Não existem vacinas ou estratégias de controle específicas descritas para a doença.

5.4 Vírus da encefalomielite hemaglutinante dos suínos

O vírus da encefalomielite hemaglutinante dos suínos (HEV) já foi descrito no Canadá, nos Estados Unidos e em alguns países europeus e

asiáticos. Mesmo nos locais onde a presença da infecção foi demonstrada, a ocorrência da doença parece ser baixa. O vírus apresenta apenas um sorotipo, que é responsável pela produção de diferentes síndromes clínicas e pertence ao grupo II dos coronavírus. A infecção pode resultar em encefalite aguda ou em uma síndrome de vômito e definhamento (*vomiting and wasting disease*, VWD). No primeiro caso, além de anorexia e letargia, são observados sinais neurológicos, tais como: tremores musculares, paresia posterior progressiva, hiperestesia, cegueira, coma e morte. A síndrome do vômito e definhamento ocorre de forma crônica e caracteriza-se por anorexia, letargia, vômito, perda progressiva de peso e constipação. Ambas as manifestações são observadas apenas em leitões nascidos de mães sorologicamente negativas, quando são infectadas nas primeiras semanas de vida. A infecção ocorre pela via nasal, por aerossóis ou por contato direto. Na encefalomielite, o vírus replica na mucosa nasal e daí se propaga para os nervos periféricos e para o encéfalo. Na síndrome do vômito e definhamento, o vírus replica inicialmente na mucosa nasal e propaga-se para as tonsilas, trato respiratório superior, encéfalo e estômago. Nas regiões em que o agente está presente, a infecção ocorre de forma endêmica e não existem vacinas disponíveis para o seu controle.

5.5 Coronavírus felino e vírus da peritonite infecciosa dos felinos

O coronavírus felino (FCoV) pertence ao grupo I dos coronavírus e apresenta dois biótipos, classificados pelas diferenças de patogenicidade. O biótipo mais frequente é o coronavírus felino entérico (FCoV), que causa diarreia leve em gatos. O outro biótipo é o agente etiológico da peritonite infecciosa felina (FIPV), uma doença de curso fatal. Dois sorotipos de coronavírus felinos foram identificados, denominados coronavírus felino tipos I e II, de acordo com as características antigênicas dos isolados de FCoV e FIPV. Os dois sorotipos possuem isolados de casos de FIP, e a grande maioria dos coronavírus felinos tem sido classificada como sorotipo I, porém alguns isolados de FIPV são encontrados no sorotipo II, que é composto, em sua maioria, por isolados entéricos.

5.5.1 Epidemiologia

Os coronavírus felinos infectam membros da família *Felidae*, causando desde infecções subclínicas até a forma mais severa da doença, que é a peritonite infecciosa (FIP). A infecção pelo FCoV é muito comum em gatos domésticos, o que foi demonstrado pela alta soropositividade na população felina de diversos países. Anticorpos contra o vírus foram detectados em 80 a 90% das amostras coletadas em gatos, e em 10 a 50% das amostras coletadas em residências que possuíam um único gato, nos Estados Unidos e Europa. No Brasil, são escassos os dados sobre a prevalência e distribuição do agente na população felina. Em São Paulo, somente uma dentre 22 amostras de soro e efusão pleural ou peritoneal de 10 gatos e um leão foi positiva por PCR. Em um estudo realizado nos arquivos do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, foram diagnosticados 13 casos de PIF entre 638 gatos necropsiados no período de 1970 a 2001.

Os animais infectados excretam o vírus em altos títulos nas fezes, sendo a rota fecal-oral a forma mais frequente de transmissão. O RNA do vírus já foi detectado em fezes de gatos saudáveis, infectados natural ou experimentalmente por períodos prolongados. Em alguns gatos, a infecção é transitória e o vírus será erradicado do organismo dentro de alguns meses após a infecção. Aproximadamente 13% dos gatos permanecem infectados cronicamente, como portadores saudáveis, excretando o vírus por períodos prolongados, possivelmente por toda vida. Apenas 5 a 10% dos gatos soropositivos para o FCoV irão desenvolver a forma severa da doença.

A presença do vírus já foi demonstrada em populações de felinos selvagens de vida livre ou cativos. Em estudos realizados na África, 25% dos felídeos selvagens foram positivos para anticorpos no soro ou ácido nucléico viral nas fezes. O guepardo, que é uma espécie em risco de extinção, é muito susceptível ao vírus, e animais dessa espécie apresentam a forma clínica da doença com maior frequência do que gatos domésticos.

Entre os gatos domésticos, foi observada uma incidência mais alta da FIP em animais de raça pura quando comparados com as raças mistas. A doença ocorre com maior frequência em

animais entre os seis meses e cinco anos de idade, sendo mais comum em animais com menos de um ano.

5.5.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos

O coronavírus felino entérico infecta as células epiteliais das vilosidades intestinais, provocando a sua destruição, apresentando manifestações clínicas de diarreia e má-absorção. Após a infecção inicial, com a apresentação ou não de manifestações clínicas, o vírus permanece replicando no intestino e sendo excretado nas fezes. A habilidade do FIPV de replicar em macrófagos e invadir os tecidos intestinais e o sangue foi considerada a responsável pela diferença na patogenia dos dois biótipos do vírus. Essa diferença foi observada em cultivos de macrófagos peritoneais, nos quais os isolados virulentos infectaram um número maior de macrófagos e produziram títulos mais altos quando comparados com os isolados avirulentos. Entretanto, tem sido demonstrada a presença do vírus no sangue de animais que não desenvolveram a forma severa da doença, por longos períodos após a infecção inicial. A presença do vírus no sangue e nos tecidos levaria à replicação contínua, propiciando o surgimento de cepas mutantes com virulência aumentada. A mutação do FIPV é muito bem documentada e consiste em uma deleção de aproximadamente 300 bp na extremidade 3' do genoma. Essa mutação foi detectada em vários isolados de tecidos de felinos que morreram da forma clínica da FIP e de gatos em que a doença foi induzida experimentalmente. A hipótese mais aceita é a de que o FIPV origina-se a partir de mutações do FCoV no animal infectado.

A infecção pelo coronavírus pode produzir enterite leve, mas a maioria dos casos de infecção experimental ou natural cursa sem manifestações clínicas. Alguns animais infectados podem desenvolver a forma severa da doença: a FIP, caracterizada pela debilitação progressiva, que culmina com a morte do animal. Os sinais iniciais não permitem a diferenciação de outras doenças sistêmicas dos felinos e incluem perda de peso, anorexia, febre crônica, letargia e debilidade. A FIP pode ocorrer sob três formas distintas: a for-

ma clássica, também chamada de efusiva ou úmida; a forma seca ou não-efusiva ou a combinação de ambas. Na forma efusiva, ocorre um aumento progressivo do volume do abdome devido ao acúmulo de líquido viscoso e amarelado na cavidade abdominal (ascite). A quantidade de líquido é variável, podendo atingir até um litro.

A cavidade torácica também pode apresentar efusão pleural, que pode resultar em sinais de insuficiência respiratória. Icterícia pode estar presente se houver envolvimento do fígado. A forma seca da doença caracteriza-se pela presença de lesões piogranulomatosas em um ou mais órgãos. Os animais com essa forma da doença podem apresentar sinais de insuficiência hepática ou renal e doença pancreática. Distúrbios neurológicos e lesões oculares também têm sido descritos.

5.5.3 Imunidade

Observações clínicas e experimentais demonstraram que animais que apresentam anticorpos contra o coronavírus felino desenvolvem uma forma mais aguda e severa da doença quando reinfetados. Essa forma é conhecida como síndrome da morte súbita. Nesses animais, as manifestações clínicas e lesões surgem rapidamente e eles apresentam também um período menor de sobrevivência.

O papel dos anticorpos preexistentes na patogenia da doença ainda não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que esses anticorpos facilitariam a replicação do vírus e levariam a uma severidade maior da doença. A replicação mais eficiente do vírus estaria associada com uma maior capacidade de infectar macrófagos, por causa do fenômeno da ADE (*antibody dependent-enhancement*), que consiste na facilitação da penetração viral em macrófagos em função da presença dos anticorpos. Nesse caso, os complexos vírus-anticorpo seriam ligados por receptores Fc de membrana do macrófago, o que facilitaria a sua penetração nas células. Em outras palavras, ao invés de proteger, os anticorpos aumentariam a eficiência da penetração e replicação viral.

A manifestação ou não dos sinais clínicos da FIP estariam ligados à resposta imune celular. Animais que apresentam uma resposta imune celular eficiente não desenvolvem a doença. Por

outro lado, animais que desenvolvem uma resposta imune celular parcial apresentam a forma não efusiva da doença. Os animais que não apresentam resposta imune desenvolvem a forma efusiva da doença.

5.5.4 Diagnóstico

O diagnóstico da FIP no animal vivo apresenta dificuldades e deve basear-se mais na investigação clínica do que em testes laboratoriais. A detecção de anticorpos por IFA e ELISA tem sido amplamente aplicada mundialmente em laboratórios de diagnóstico. São considerados positivos para o vírus os animais com títulos moderados a altos. Entretanto, felinos que apresentam sinais clínicos podem ser soronegativos; assim como animais que nunca apresentaram manifestações clínicas podem ter títulos altos de anticorpos. Então, mesmo que o diagnóstico sorológico seja amplamente utilizado, não deve ser considerado definitivo. A apresentação de títulos altos de anticorpos e de sinais clínicos compatíveis com a FIP pelo animal deve ser considerada importante. Se o felino apresenta títulos baixos ou é soronegativo, a FIP deve ficar no final da lista das suspeitas. Até há pouco tempo, o diagnóstico definitivo só era possível após a morte do animal, pela patologia e histopatologia. Atualmente é possível realizar o diagnóstico através de técnicas de biologia molecular, e vários protocolos de RT-PCR já foram descritos.

5.5.5 Prevenção e controle

O controle e prevenção da infecção pelo FCoV são complicados pelo fato de o vírus estar amplamente disseminado na população felina. Algumas recomendações foram elaboradas no II Simpósio de Coronavírus Felino e Peritonite Infecciosa Felina, realizado na Escócia, em 2002. Uma das medidas recomendadas é o isolamento de gatas prenhes duas a três semanas antes do parto, com a subsequente quarentena da gata e dos filhotes, e desmame dos filhotes com a idade de quatro a seis semanas. O objetivo desse procedimento seria, principalmente, o de retardar a ocorrência da infecção, pois é muito difícil evitá-

la por toda a vida, em razão da ampla disseminação do vírus.

O controle da doença pelo uso de vacinação é um ponto polêmico. Até o momento já foram produzidas várias vacinas que falharam em conferir proteção. Vacinas produzidas com vírus semelhantes ao FCoV, como o coronavírus humano, canino e suíno, foram testadas sem sucesso. O maior problema para a produção de vacinas é o possível papel dos anticorpos na exacerbação dos sinais clínicos (ADE). Este efeito foi observado em testes vacinais realizados com o FCoV atenuado e também com um vírus *vaccinia* recombinante, expressando a proteína S.

A indução de uma forte resposta imune celular parece ser o ponto crítico para a prevenção da doença. Vacinas com plasmídeos DNA ou vetores virais carreando genes que expressam proteínas internas do vírus como a M (membrana) e a N (nucleocapsídeo) têm sido sugeridas para induzir preferencialmente resposta celular e, assim, minimizar o risco de ADE.

Atualmente existe uma vacina comercial disponível. Esta vacina foi produzida com um vírus mutante ts e protegeu gatos contra a FIP; entretanto, a sua eficácia e segurança seguem sendo temas de debate.

5.6 Coronavírus canino

O coronavírus canino (CCoV) está associado com surtos esporádicos de enterite em cães. O vírus foi isolado, pela primeira vez, na Alemanha, em 1971, a partir das fezes de cães com enterite. Desde então, esse agente tem sido amplamente detectado em cães clinicamente saudáveis ou em cães que apresentam vômitos e diarreia severa.

As características gerais de estrutura e do ciclo de replicação do CCoV são semelhantes aos descritos para a família *Coronaviridae*. O CCoV pertence ao grupo I dos coronavírus e também é propenso a recombinações no genoma. Os genes das proteínas M e S, que possuem importantes propriedades biológicas e imunológicas, são os principais locais de recombinação. Diferenças na sequência de nucleotídeos desses genes indicam a existência de uma diversidade genética entre cepas de referência e isolados de campo. Alguns

autores sugerem a existência de dois genótipos: o CCoV tipo I e o CCoV tipo II. Alguns isolados altamente virulentos já foram identificados, associados com altos índices de mortalidade. Esses relatos demonstram a necessidade de se investigar as possíveis implicações dessas variações antigênicas na eficácia das vacinas contra o CCoV.

5.6.1 Epidemiologia

Cães de todas as idades e raças são susceptíveis à infecção pelo CCoV. No entanto, os filhotes são mais sensíveis e frequentemente desenvolvem sinais clínicos de enterite, além de apresentarem índices maiores de mortalidade. A doença ocorre com maior frequência em canis, abrigos e locais onde há convívio entre os cães. O vírus é altamente contagioso e dissemina-se rapidamente na população canina.

A principal fonte do vírus são as fezes de cães infectados, além de fômites contaminados, e a infecção ocorre principalmente pela via oral. O vírus pode ser excretado nas fezes por até duas semanas após a infecção, porém alguns estudos demonstraram a eliminação por longos períodos (entre 37 e 180 dias). Cães sem manifestações clínicas também podem excretar o vírus nas fezes por períodos prolongados.

Há evidências sorológicas de que o CCoV apresenta distribuição mundial. Dados de prevalência são variáveis e alguns fatores que podem interferir nos resultados desses estudos são listados a seguir: a) pequeno número de amostras testadas; b) uso de diferentes técnicas de detecção de anticorpos; c) presença de amostras de soro de cães vacinados; e d) maior importância da imunidade local após a infecção natural.

Estudos de prevalência, realizados na Austrália, demonstraram que 15,8% dos cães que convivem com até outros dois cães no mesmo domicílio apresentavam anticorpos contra o CCoV; enquanto 40,8% dos animais mantidos em canis eram soropositivos. Inquéritos sorológicos, realizados na Itália, detectaram 90,8% de animais positivos; na Inglaterra, 76%; na Turquia, 74,3%; e, no Japão, 44,1%. No Sul do Brasil, um estudo com cães não-vacinados de Santa Maria detectou 50,4% (412/817) amostras positivas.

A infecção pelo CCoV também foi demonstrada em outros animais, como os coiotes (*Canis*

latrans Say), as hienas (*Crocuta crocuta*) e os lobos (*Canis lupus*). Além dos cães e outros canídeos, gatos domésticos também podem ser infectados, demonstrando soro-conversão, porém sem o desenvolvimento de sinais clínicos.

5.6.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos

A infecção dos cães ocorre pela via fecal-oral. Após a ingestão, o CCoV atinge o intestino delgado e replica nas células epiteliais das vilosidades, e a sua excreção nas fezes se inicia entre um e dois dias após a infecção. O vírus passa pelo estômago, resistindo ao pH ácido, e, após a replicação no epitélio do duodeno, dissemina-se na superfície intestinal até o íleo. Não foi demonstrada a replicação do vírus no cólon. O vírus pode se disseminar aos linfonodos mesentéricos e, ocasionalmente, alcança o baço e o fígado. Os sinais clínicos se iniciam entre um e quatro dias após a infecção.

Como a mortalidade é geralmente baixa, as necropsias não são frequentes. Macroscopicamente, o intestino delgado encontra-se dilatado, o conteúdo é líquido e de coloração amarelada ou esverdeada. A mucosa intestinal encontra-se hiperêmica e, em alguns casos, hemorrágica. Os linfonodos mesentéricos podem estar edemaciados.

Microscopicamente, a replicação viral resulta em atrofia e fusão das vilosidades intestinais, depressão das criptas, achatamento das células epiteliais, aumento na celularidade da lâmina própria e aumento de células globosas.

Os cães infectados podem apresentar sinais leves a moderados de enterite. As manifestações mais frequentemente observadas são: diarreia, vômito, desidratação, perda de apetite, letargia, o que, ocasionalmente, levam os cães jovens à morte. A infecção conjunta com outros vírus (parvovírus, adenovírus ou vírus da cinomose), bactérias ou parasitas geralmente produz uma forma mais severa e até mesmo fatal da doença. O estresse é outro fator que pode agravar as manifestações clínicas. Quando não ocorre agravamento dos sinais, a recuperação clínica acontece após uma semana de infecção. Embora o CCoV não seja frequentemente associado com doença

respiratória em caninos, um estudo recente relata a presença de um coronavírus em cães com sinais respiratórios. O agente identificado nesses casos, no entanto, provavelmente seja um novo coronavírus canino.

5.6.3 Imunidade

A infecção pelo CCoV é restrita ao intestino e geralmente não ocorre viremia. Portanto, os títulos de anticorpos produzidos em resposta à infecção são geralmente baixos. Em inoculações experimentais, a presença de IgM foi inicialmente detectada no plasma três dias após a inoculação. Já a IgG foi detectada entre o 4º e o 7º dia pós-inoculação. Anticorpos neutralizantes contra o vírus podem ser detectados a partir de dez dias após a infecção, e pequenas quantidades de IgG, IgM e IgA podem ser detectadas no duodeno.

A infecção natural e a vacinação com vacina viva atenuada pela via oronasal induzem altos níveis de IgA no intestino. Estas imunoglobulinas estão diretamente relacionadas com a proteção contra a infecção pelo CCoV. Vacinas atenuadas, aplicadas pela via oral, conferem maior proteção, pois a resposta imune mediada por IgA, associada à mucosa, previne a adsorção do CCoV às células epiteliais das vilosidades intestinais.

A imunidade materna é capaz de proteger os neonatos por um período variável, que depende do título de anticorpos que a mãe transfere aos filhotes. Há descrições de duração da imunidade passiva por quatro a cinco semanas; no entanto, os estudos a respeito da duração da resposta imune ao CCoV são escassos.

5.6.4 Diagnóstico

A detecção do vírus nas fezes ou no intestino constitui-se na forma mais objetiva de diagnóstico, diferenciando-a da enterite por outros agentes, como o parvovírus, o rotavírus e os picornavírus. O diagnóstico laboratorial é freqüentemente realizado por ME a partir das fezes. O isolamento do vírus não é muito utilizado, entretanto diferentes laboratórios obtiveram sucesso utilizando

células primárias de rim, timo e membrana sinovial canina. As células de linhagem de rim canino A-72 são particularmente susceptíveis ao CCoV, além de células de embrião e de linhagem de rim felino (CRFK). O vírus produz efeito citopático caracterizado pela formação de sincícios; a confirmação da identidade do agente é realizada por IFA. Esta técnica também pode ser realizada em crioseções de intestino. Existem kits baseados em cromatografia para a detecção de antígenos do CCoV em fezes de cães.

As técnicas de RT-PCR e RT-PCR em tempo real realizadas diretamente das fezes também têm sido utilizadas, principalmente em pesquisas. Testes de vacinas experimentais demonstraram que essas técnicas detectam quantidades menores de vírus excretadas nas fezes, por períodos maiores, quando comparadas com o isolamento viral.

A sorologia é de pouca utilidade, em termos de diagnóstico, por dois fatores: a) o coronavírus está muito distribuído na população canina e a infecção, muitas vezes, é subclínica; b) a detecção de anticorpos no soro não indica exposição recente ao vírus. A sorologia pareada poderia ser útil, demonstrando soroconversão. Para a detecção de anticorpos no soro, são utilizadas as técnicas de SN, IPX e ELISA. Um kit de ELISA que detecta IgM está disponível comercialmente, para uso em clínicas e consultórios; a presença desta imunoglobulina no soro indica infecção recente pelo CCoV.

5.6.5 Prevenção e controle

Para a prevenção da infecção e doença pelo CCoV, deve-se evitar o contato de cães soronegativos com cães infectados. Condições de estresse, causadas pela falta de sanidade, aglomeração, desmame e infecções concomitantes por parasitas e outros vírus favorecem o desenvolvimento de enterite nos cães infectados. No meio ambiente, o vírus é facilmente inativado pelo calor e por solventes lipídicos. No entanto, em temperaturas baixas, pode manter-se infeccioso por longos períodos. O CCoV é estável sob pH ácido, sobrevivendo a um extremo de pH 3.0.

O tratamento da enterite pelo CCoV é de suporte e baseia-se na restituição do equilíbrio hídrico-eletrolítico, além do controle de infecções bacterianas e parasitárias concomitantes.

Existem várias vacinas multivalentes que possuem antígenos do CCoV inativados. No entanto, a eficácia dessas vacinas é questionável pela importância da imunidade local na mucosa intestinal, uma vez que vacinas inativadas não induzem a produção de IgA local. Anticorpos no soro não são capazes de prevenir a infecção, apenas reduzem a gravidade da doença, e isto só ocorre a partir de três semanas após a aplicação das vacinas. A existência de diversidade antigênica entre cepas e isolados do CCoV também compromete a eficácia das vacinas inativadas contra o CCoV.

Vacinas vivas atenuadas já foram testadas, e resultados promissores foram demonstrados através da aplicação oral em uma única dose. Cães vacinados pela via oral apresentaram títulos mais altos de IgA do que cães vacinados pela via intramuscular. Após o desafio, os cães que receberam a vacina pela via oral não excretaram o vírus nas fezes, enquanto os cães vacinados pela via intramuscular excretaram o vírus por um período médio de 10 dias. Em outro estudo semelhante, testando uma vacina inativada, aplicada pela via intramuscular, os animais excretaram o vírus nas fezes por um tempo médio de 11 dias. Uma vacina atenuada foi licenciada, em 1983, nos Estados Unidos, mas a comercialização foi proibida logo em seguida devido ao grande número de reações adversas. Essas reações foram observadas principalmente quando a vacina foi aplicada em conjunto com vacinas atenuadas para o parvovírus, vírus da cinomose e adenovírus.

5.7 Coronavírus canino respiratório

Desde a década de 1970, descreve-se a existência do coronavírus canino (CCoV), associado com doença entérica. Ao contrário de vários coronavírus de outras espécies, que são associados com sinais respiratórios. No entanto, relatos recentes sugerem um coronavírus como agente etiológico de doença respiratória em cães.

Este coronavírus foi isolado de uma população canina abrigada em um centro de recolhimento de cães de rua na Inglaterra. Os animais apresentavam sinais clínicos semelhantes à traqueobronquite infecciosa canina, também conhecida como “tosse dos canis”. No entanto, a doença respiratória não foi controlada com vacinas comerciais contra essa síndrome, aplicadas previamente ao diagnóstico laboratorial do surto.

A análise filogenética indicou que este vírus, denominado coronavírus canino respiratório (CRCV), apresenta uma grande homologia com os coronavírus respiratórios de bovinos (BCoV, 98,8%) e humanos (HCoV-OC43, 98,4%), pertencentes ao grupo II do gênero coronavírus, e pequena homologia com o CCoV (cepa 1-71, 68,53%), que é classificado no grupo I. Além disso, constatou-se a presença do gene da hemaglutinina esterase (HE) na cepa respiratória; uma característica dos coronavírus pertencentes ao grupo II. Caso esses dados sejam confirmados, este vírus deverá ser classificado dentro da família *Coronaviridae*, como um coronavírus canino distinto do CCoV.

Embora estudos de prevalência sejam escassos, um trabalho recentemente publicado demonstrou soropositividade de 17,8% (160/898) para o CRCV em cães no Japão. Um estudo retrospectivo demonstrou que amostras de soro coletadas de cães, já em 1998, apresentavam anticorpos contra o vírus, sugerindo a existência prévia do CRCV em cães daquele país.

5.8 Coronavírus bovino

O coronavírus bovino (BCoV) é um agente envolvido principalmente com diarreia em bezerros, mas também pode estar envolvido em doença respiratória em bezerros e com diarreia em bovinos adultos. Esse vírus está amplamente disseminado na população bovina e foi identificado, pela primeira vez, em casos de diarreia em bezerros nos Estados Unidos, em 1973.

O BCoV possui uma morfologia típica dos coronavírus, com diâmetro aproximado de 120 nm, e apresenta a proteína hemaglutinina-esterase (HE) no envelope, além das proteínas S, M e

E, sendo classificado como um coronavírus tipo II. O genoma possui aproximadamente 32 kb e a glicoproteína S do envelope é clivada em duas subunidades: S1 e S2.

5.8.1 Epidemiologia

A infecção pelo BCoV resulta em alta morbidade e baixa mortalidade entre os animais infectados. As fezes são consideradas a maior fonte de vírus infeccioso, mas os animais infectados podem excretar o vírus também nas secreções nasais.

O BCoV é endêmico na população bovina, e anticorpos contra o vírus podem ser detectados em grande parte da população. Evidências indicam que o vírus é mantido nos rebanhos em bezerros e vacas que apresentam infecção clínica ou crônica. O estado de portador e infecção persistente também têm sido sugeridos, mas ainda não foram comprovados. Infecções recorrentes no mesmo animal também podem ocorrer.

Estudos epidemiológicos demonstraram a presença desse vírus em vários países. O BCoV foi detectado nas fezes de 28,1% dos animais testados em um inquérito na Turquia. Na Coreia, o BCoV foi detectado em 32 propriedades com animais que apresentavam sinais clínicos da disenteria de inverno. Nos Estados Unidos e no Canadá, a presença do BCoV tem sido frequentemente descrita nas secreções nasais e fezes de bovinos confinados que apresentam sinais de doença respiratória. Anticorpos contra esse vírus foram detectados em 89% das amostras de leite de 2.236 propriedades testadas na Suécia.

No Brasil, foram realizados poucos estudos de prevalência, mas a presença do vírus já foi demonstrada no estado de São Paulo. Setenta e duas amostras fecais de bezerros com diarreia foram coletadas em várias propriedades, e 39% delas foram positivas para o vírus. O BCoV também foi detectado em amostras fecais de bovinos adultos com diarreia durante o inverno, sugerindo a ocorrência da forma de disenteria de inverno no rebanho brasileiro. Embora o número de estudos seja reduzido, é provável que a infecção esteja amplamente difundida no rebanho bovino brasileiro, a exemplo do que ocorre em outros países.

5.8.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos

A manifestação clínica mais comum da infecção pelo BCoV é a diarreia em bezerros de três a 21 dias de idade, embora o vírus possa infectar e causar doença animais com até três meses. A doença é caracterizada pela presença de fezes líquidas no intestino, leite coagulado nas fezes, febre, debilidade, depressão e desidratação severa. O choque e a morte podem ocorrer caso não sejam adotadas medidas de controle e tratamento de suporte.

Outra doença atribuída à infecção pelo BCoV é a disenteria de inverno, que ocorre em regiões frias, nas quais os animais são estabulados durante o período de frio ou criados em confinamentos. Essa doença caracteriza-se por diarreia aguda, fétida e, muitas vezes, sanguinolenta em animais jovens e adultos. Também se observa a redução na produção de leite, depressão e anorexia.

O BCoV tem sido isolado também de bezerros confinados que apresentam sinais de doença respiratória. No entanto, a participação do agente na produção de doença respiratória ainda não é totalmente comprovada. A inoculação intranasal com as cepas virais de origem respiratória induziu diarreia, mas não induziu sinais respiratórios. Por outro lado, a vacinação de bezerros contra o BCoV reduziu a prevalência de doença respiratória, sugerindo um papel do vírus na enfermidade.

O vírus penetra pela via oral e atinge o intestino pela via digestiva, onde replica em enterócitos das vilosidades da porção distal do intestino delgado e também em uma pequena extensão do cólon. A diarreia ocorre como consequência da má-absorção e distúrbios da atividade intestinal, provocados pela atrofia das vilosidades induzida pela replicação viral. Ocorre uma rápida perda de água e eletrólitos, o metabolismo da glicose e da lactose podem ser alterados, ocorrendo hipoglicemia e acidose láctica, podendo resultar em choque e morte.

Até o presente momento não foi possível identificar diferenças sorológicas ou moleculares definitivas entre as cepas que causam as manifestações entéricas daquelas associadas com sinais respiratórios.

Inoculações experimentais em vacas e bezerros demonstraram que as mesmas cepas de BCoV podem causar diarreia em terneiros e disenteria de inverno em animais adultos. Estudos comparativos indicaram que os vírus isolados do trato respiratório ou do intestino foram capazes de replicar em ambos os tecidos de bezerros inoculados. A inoculação experimental com a cepa respiratória resultou em doença entérica em bezerros privados de colostro.

Na necropsia, pode-se observar os intestinos distendidos com fezes líquidas e moldadas por muco no cólon. Na histopatologia, observa-se atrofia severa das vilosidades do intestino delgado, com descamação do epitélio e substituição das células epiteliais de absorção por células imaturas com morfologia cubóide.

5.8.3 Imunidade

A resposta imune humoral de bovinos à infecção pelo BCoV foi estudada em animais com a forma respiratória da doença e também pela inoculação experimental em bezerros privados de colostro. Alguns dias após a infecção, são detectados anticorpos contra as proteínas estruturais S, HE, N e M. Anticorpos com atividade neutralizante são direcionados contra as glicoproteínas de superfície S e HE. Após a inoculação da cepa respiratória, o final da excreção viral nas secreções nasais coincidiu com o aparecimento de anticorpos neutralizantes, sugerindo um importante papel desses anticorpos na erradicação da infecção. O papel da imunidade celular na proteção contra o BCoV é desconhecido.

A neutralização do vírus no lúmen intestinal por IgA, parece ser a forma mais efetiva de proteção contra a diarreia neonatal. Nesse caso, a imunidade passiva é de grande importância na proteção dos bezerros nos primeiros dias de vida. Imunoglobulinas das classes IgG1, IgG2 e IgA são detectadas no colostro de vacas com altos títulos de anticorpos contra o BCoV. A queda na quantidade de anticorpos na transição de colostro para leite tem sido apontada como uma possível causa

da alta incidência da doença em bezerros a partir do quinto dia de vida.

5.8.4 Diagnóstico

A diarreia neonatal em bezerros é uma síndrome de etiologia complexa com o possível envolvimento de coronavírus, rotavírus, bactérias entéricas (*E. coli* e *Salmonella* spp.), protozoários e parasitas. Esses agentes podem produzir a doença isoladamente ou em conjunto. Na maioria dos casos, as manifestações clínicas são muito semelhantes, o que dificulta a realização do diagnóstico diferencial com a determinação da causa específica. Por essa razão, o diagnóstico etiológico definitivo requer a realização de provas laboratoriais.

A ME realizada nas fezes é a opção mais indicada para a realização do diagnóstico. A IFA também pode ser aplicada para a pesquisa de antígenos do vírus no intestino. O isolamento do vírus pode ser realizado em células primárias de rim bovino ou em células da linhagem Vero. O isolamento requer o tratamento prévio do inóculo com tripsina, para facilitar a penetração e replicação viral. Os isolados de campo são difíceis de isolar e, geralmente, requerem várias passagens para adaptação ao cultivo celular antes de produzirem efeito citopático. A técnica de RT-PCR também tem sido utilizada para o diagnóstico do BCoV.

5.8.5 Prevenção e controle

A prevenção completa da infecção pelo BCoV não é possível, mas boas condições de manejo e higiene podem reduzir as consequências da infecção. Atenção especial deve ser dispensada para a sanidade durante o parto. Vacinas vivas modificadas estão disponíveis no mercado e a sua aplicação é recomendada, quando o BCoV está presente na propriedade, em vacas prenhes e em recém-nascidos. A vacinação das vacas objetiva induzir altos títulos de anticorpos e, assim, aumentar o nível de imunidade passiva transmitida pelo colostro.

5.9 Vírus da bronquite infecciosa das galinhas

A infecção pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) foi descrita pela primeira vez no estado da Dakota do Norte, nos Estados Unidos, em 1931. Essa infecção pode manifestar-se por distúrbios respiratórios, reprodutivos e/ou renais. O IBV é o vírus protótipo da família *Coronaviridae*, pertence ao grupo III dos coronavírus e, como outros membros dessa família, apresenta uma grande variação nos antígenos de superfície, o que implica na existência de vários sorotipos e subtipos. Essa característica biológica resulta em várias consequências, principalmente em relação a patogenia e epidemiologia desse vírus.

5.9.1 Epidemiologia

O IBV está presente em todos os países que possuem avicultura comercial ou doméstica. Surtos da doença podem ocorrer mesmo em populações vacinadas. As cepas Massachussets (Mass) e Connecticut (Conn) são consideradas padrão para o vírus, sendo, assim, utilizadas em várias vacinas. Em alguns países, vários sorotipos do vírus estão circulando na população avícola, o que dificulta o diagnóstico e controle.

A galinha é considerada a principal e única espécie naturalmente susceptível ao vírus e que desenvolve a doença. Entretanto, isolados de coronavírus muito semelhantes ao IBV têm sido associados com doença respiratória e renal em criações comerciais de faisões. Os coronavírus isolados de perus não produzem doença em galinhas e vice-versa.

O IBV é transmitido principalmente por aerossóis, mas as aves se infectam também pela ingestão de água e alimentos contaminados com material fecal. O vírus é muito contagioso e é encontrado em altos títulos na traquéia de aves doentes e nas fezes de aves em recuperação. O vírus pode sobreviver por dias ou até semanas no meio ambiente, principalmente sob baixas temperaturas. Os sinais clínicos se desenvolvem dentro de 18 a 36 horas após o contato com as aves infectadas. A infecção é geralmente resolvida em aproximadamente 14 dias.

As aves infectadas são as maiores fonte de infecção e contaminação no meio ambiente. Após a recuperação da doença clínica, algumas aves permanecem persistentemente infectadas, excretando o vírus por um longo período nas fezes e em aerossóis. O local de persistência ainda não foi definido, mas o tecido renal é um possível candidato.

5.9.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos

O vírus replica inicialmente no trato respiratório, de onde se dissemina pelo sangue para vários órgãos. Além do trato respiratório, o vírus tem sido isolado também dos ovidutos, rins e trato intestinal. O vírus pode ser encontrado também na bursa de Fabricius, o que poderia explicar os efeitos imunossupressivos do IBV.

Os achados macroscópicos mais frequentemente observados são a presença de exsudato seroso, catarral ou caseoso na traquéia, fossas nasais, brônquios e, eventualmente, nos sacos aéreos. Em aves de postura, o material fluido da gema pode ser encontrado na cavidade abdominal, em função do rompimento do ovo em formação e das lesões permanentes no oviduto. Quando a cepa possui nefrotropismo, os rins podem apresentar-se pálidos e edemaciados, com deposição de uratos nos túbulos e ureteres.

Microscopicamente podem ser observadas: infiltração linfóide, hiperplasia, edema, descamação e perda de cílios no epitélio respiratório. A intensidade das lesões pode variar de acordo com a virulência da cepa. No tecido renal, pode ser observada nefrite intersticial aguda ou subaguda.

A forma respiratória da doença é a mais comum e caracteriza-se por respiração ofegante, associada com acúmulo de material caseoso na siringe; tosse, estertores, espirro e descarga nasal em aves jovens. O consumo de água e alimento é reduzido e, como consequência, o ganho de peso também fica reduzido. Em aves com idade superior a seis semanas, os sinais são semelhantes, porém a descarga nasal é observada com menor frequência. Nessas aves, a infecção pode passar despercebida. Em aves de postura, são observadas a queda na produção e da qualidade dos

ovos, além de sinais respiratórios. É comum a postura de ovos com casca mole, deformada ou mesmo sem casca, devido às lesões produzidas nos ovidutos. Essas lesões podem ser produzidas de forma permanente em aves jovens e, neste caso, o problema somente será detectado na época de postura.

Algumas cepas do IBV apresentam um tropismo maior pelo tecido renal, produzindo lesões proeminentes nos rins. As aves infectadas por essas cepas apresentam depressão, penas arrepiadas e aumento no consumo de água. A urolitíase pode ser uma das conseqüências da infecção.

A taxa de mortalidade da doença respiratória é geralmente baixa e se deve, principalmente, a complicações por infecções bacterianas secundárias, principalmente por *Escherichia coli*. Em alguns casos, foram observados edema facial, aerossaculite e uma taxa de mortalidade um pouco mais elevada. A infecção com cepas de patogenicidade mista, que causam lesões na traquéia e rins, pode induzir mortalidade de até 25%.

Além das perdas por ganho de peso reduzido e mortalidade, a infecção pelo IBV em frangos de corte leva ao aumento na condenação de carcaças durante o abate.

5.9.3 Imunidade

Os mecanismos imunes, associados com a eliminação e proteção contra o IBV, ainda não estão esclarecidos, mas os diferentes ramos da resposta imune parecem estar envolvidos em maior ou menor grau. A resposta imune inata através do interferon (IFN) e a resposta imune adaptativa através de anticorpos e linfócitos T parecem desempenhar um papel importante.

O grande número de sorogrupos e sorotipos é um fator complicador na indução da proteção contra esse vírus. As aves naturalmente infectadas ou vacinadas com o IBV estarão protegidas contra o vírus homólogo, mas a proteção cruzada contra cepas heterólogas é variável.

Evidências indicam que a resposta imune protetora é induzida principalmente por antígenos da superfície do vírus. Estudos realizados com as proteínas S1, N e M demonstraram que apenas os epítomos de S1 foram capazes de

induzir proteção contra o vírus. Os principais determinantes antigênicos do IBV encontram-se em regiões das glicoproteínas S1 e S2. Peptídeos recombinantes construídos com seqüências da S1 e S2 induziram resposta imune humoral, celular e proteção frente ao desafio; enquanto peptídeos da proteína N não induziram proteção, apesar da indução de anticorpos e linfócitos T.

O papel dos anticorpos na proteção é controverso, uma vez que alguns pesquisadores encontraram boa correlação entre títulos de anticorpos e proteção; enquanto outros não encontraram correlação alguma. Anticorpos das classes IgG e IgA foram detectados na lágrima, em lavados traqueais e no oviduto, e também nos conteúdos cecais e duodenais de aves inoculadas com o vírus. Estes anticorpos foram detectados já aos sete dias após a inoculação.

A proteção conferida pela imunização com a proteína recombinante S1 não foi correlacionada com títulos de anticorpos. Da mesma forma, altos níveis de anticorpos na secreção lacrimal não determinaram proteção contra o desafio viral. Por outro lado, a importância dos anticorpos na resolução da infecção ficou demonstrada em experimentos que detectaram um aumento na severidade da doença produzida pelo IBV em aves bursectomizadas, quando comparadas com aves normais. Reforçando esta hipótese, títulos altos de anticorpos neutralizantes na secreção nasal desempenharam importante papel na proteção contra a reinfecção.

Evidências para a participação da resposta celular vieram da detecção de linfócitos Tc específicos para o IBV em secreções respiratórias de aves infectadas. A importância dessas células na proteção contra o IBV ficou demonstrada pela transferência passiva de linfócitos Tc de aves infectadas para pintos, que foram posteriormente desafiados. Os pintos que receberam essas células ficaram parcialmente protegidos, apresentando uma forma mais branda da doença. Esses resultados indicam que, embora os Tc pareçam possuir um papel importante, este não é o único mecanismo atuante na proteção contra o vírus.

A imunidade passiva transferida da galinha para o pinto confere alguma proteção contra vírus homólogo. Pintos com títulos altos de anticorpos foram eficientemente protegidos no primeiro dia de vida, mas não apresentaram a mesma prote-

ção aos sete dias de idade. Neste caso, a proteção apresentou uma correlação significativa com a presença de níveis altos de anticorpos no sistema respiratório, mas não no soro.

5.9.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial do IBV pode ser realizado pelo isolamento e identificação do vírus. O material mais adequado para o isolamento viral é a traquéia, cujo material pode ser coletado com o auxílio de suabes ou fragmentos de tecido durante o exame *post-mortem*. Fragmentos dos rins e dos ovidutos também são indicados para o isolamento, pois o vírus pode replicar nesses tecidos. Suabes cloacais e tonsilas cecais também podem ser coletados.

O método mais utilizado para o isolamento do vírus é a inoculação na cavidade alantóide de embriões de galinha com nove a onze dias. As alterações produzidas pelo vírus são o nanismo e congestão dos vasos sanguíneos, visíveis ao exame em ovoscópio. Em muitos casos, são necessárias três a quatro passagens para se observar as lesões. Algumas cepas do vírus podem matar os embriões em 48 a 72 horas. O isolamento através de uma ou no máximo duas passagens de 24 horas em ovos embrionados, com posterior detecção por RT-PCR, é uma estratégia que tem sido bastante utilizada por vários laboratórios.

Outra forma de isolar o vírus é a inoculação em explantes de anel traqueal de pintos de um dia. Nesse caso, a presença do vírus será detectada pela ciliostase (parada do movimento ciliar) que ocorre dois a três dias após a inoculação. A utilização de cultivos celulares não é recomendada para o isolamento, porque é necessária uma adaptação prévia dos vírus aos cultivos. A propagação do IBV em cultivos celulares é utilizada somente para a realização de técnicas sorológicas e pesquisas com cepas adaptadas.

A identificação do vírus pode ser realizada por IFA, IPX, ME ou imunodifusão em gel de ágar (IDGA). ELISA utilizando anticorpos monoclonais pode ser aplicada para detectar o vírus e também para determinar os sorotipos no fluido alantóide ou cultivos de traquéia. As técnicas moleculares, como RT-PCR e nested-PCR, têm

sido cada vez mais utilizadas. Essas técnicas permitem a obtenção de resultados mais acurados quando se objetiva identificar diferentes cepas do vírus.

Para a detecção de anticorpos contra o IBV, podem ser empregados os testes de inibição da hemaglutinação (HI), SN, IDGA e ELISA. A sorologia é complicada pela grande quantidade de sorotipos existentes que apresentam antígenos específicos de grupo e específicos do sorotipo. A técnica de ELISA é rotineiramente utilizada para monitoramentos e pesquisa e detecta antígenos de grupo. A SN e HI são consideradas sorotipo-específicas.

5.9.5 Prevenção e controle

O controle da bronquite infecciosa é realizado pela vacinação, com vacinas atenuadas administradas na água, em aerossóis ou diretamente na conjuntiva. Vacinas inativadas de aplicação individual também são utilizadas. Grande parte das vacinas contém a cepa Massachussets, por ter sido este vírus inicialmente isolado de vários países. Em alguns países, são incluídas cepas locais, por causa da grande variação antigênica do vírus.

As aves de corte são geralmente vacinadas com um ou sete dias de idade e não recebem reforço. Para aves de postura, são recomendados diferentes protocolos de vacinação, com uma vacinação inicial no pinto (um ou sete dias) e um ou mais reforços durante o período de postura. Não é recomendada a aplicação da primeira dose de vacina no pinto de um dia pela possibilidade de interferência da imunidade passiva. Não obstante, este é um procedimento freqüentemente utilizado.

5.10 Coronavírus dos perus

O coronavírus dos perus (*turkey coronavirus* – TCoV) é o agente etiológico da doença conhecida como *Bluecomb Disease* (doença da crista azul), sendo classificado como um coronavírus grupo II. O TCoV foi inicialmente isolado em criatórios do estado americano de Minnessota, na década de 1950. Posteriormente, o agente foi identificado

em várias regiões daquele país, no Canadá e na Austrália. A doença caracteriza-se por uma enterite que cursa com diarreia, anorexia, depressão e perda de peso. Perus de todas as idades são susceptíveis, mas a doença é mais freqüente em peruzinhos com poucas semanas de vida. A mortalidade é variável e depende de outros fatores, como a presença de infecções secundárias, condições climáticas e práticas de manejo. A transmissão do TCoV ocorre pela via fecal-oral, de forma direta ou por utensílios, alimentos, água e outros veículos contaminados. A transmissão mecânica por cascudinhos dos aviários, aves silvestres, cães, roedores e moscas também tem sido esporadicamente descrita. Perus recuperados da infecção são resistentes à reinfecção pelo TCoV, e esta resistência parece estar associada com a presença de IgA na mucosa intestinal. O diagnóstico do TCoV pode ser realizado pela detecção do vírus nas fezes ou no intestino, pela microscopia eletrônica ou por imunoistoquímica. Não há vacinas disponíveis no mercado contra este vírus.

Uma doença entérica nova de perus, que cursa com altos índices de morbidade e mortalidade, vem sendo observada em criações industriais de perus em vários países, inclusive no Brasil. Esta doença foi denominada de síndrome da mortalidade por enterite em peruzinhos (*poult enteritis-mortality syndrome* – PEMS). Os sinais clínicos são: diarreia, depressão severa, desidratação, anorexia, imunossupressão e perda de peso. A etiologia dessa doença não está totalmente esclarecida; no entanto, acredita-se que o TCoV possua um papel importante na sua etiologia. A detecção de maior prevalência do vírus em áreas em que a doença ocorre, quando comparada com áreas indenadas, sugerem essa associação. Além disso, a co-infecção de perus de poucos dias de vida com o TCoV e a *Escherichia coli* reproduziu as manifestações clínicas observadas nos surtos naturais. Por outro lado, a infecção apenas com o TCoV não induziu a doença e, em alguns casos de doença natural, o vírus não pode ser isolado. Portanto, o papel do TCoV na PEMS ainda é uma questão controversa, embora as evidências indiquem alguma participação do agente na etiologia dessa doença.

6 Torovírus de interesse veterinário

Os torovírus têm sido detectados em humanos com gastroenterite (HToV) e em suínos (PToV), além de bovinos e eqüinos. São conhecidos dois torovírus que infectam bovinos: o torovírus bovino (BToV) e o vírus bredda bovino (BRV); e dois que infectam eqüinos: o torovírus eqüino (EToV) e o vírus berne eqüino (BEV). Somente o BRV e o BEV produzem doença clínica em seus hospedeiros. Anticorpos contra o BRV e o BEV já foram detectados em vários outros mamíferos.

Estudos genéticos demonstraram a semelhança dos torovírus com os outros membros da família *Coronaviridae* na estrutura, na organização genômica e na estratégia de replicação, com a produção de mRNA subgenômicos. Os vírions apresentam uma morfologia pleomórfica, com um nucleocapsídeo tubular, e, quando examinados sob microscopia eletrônica, exibem uma forma de rim ou de bacilo. Esses vírus possuem um genoma RNA de sentido positivo com 25 a 30 kb.

6.1 Vírus Berne eqüino

O vírus Berne eqüino (BEV) foi isolado e identificado em Berna, na Suíça, em 1983, de material proveniente de um eqüino com diarreia. Anticorpos contra o vírus foram posteriormente detectados em eqüinos de outros países da Europa, mas ainda não houve descrição de outros casos da doença. O vírus foi extensivamente estudado e, pelas suas características, foi classificado nesse gênero. Aparentemente, esse vírus possui pouca importância como patógeno para a espécie eqüina. O torovírus eqüino (EToV) pertence ao gênero torovírus, no entanto não é associado a doença nessa espécie.

6.2 Vírus Bredda bovino

O vírus Bredda bovino (BRV) causa diarreia e desidratação em bovinos naturalmente infectados ou após a inoculação experimental. O vírus infecta células epiteliais dos intestinos delgado e grosso de bezerros de até cinco a seis meses

de idade. A diarreia ocorre 24 a 72 horas após a inoculação, juntamente com anorexia e depressão, que podem durar de três a cinco dias. O vírus produz lesões nas células das vilosidades e criptas intestinais, causando necrose e exfoliação dos enterócitos. O BRV não replica bem em cultivo celular e foi associado com enterite, pela primeira vez, em 1982. O vírus já foi detectado na Holanda, Alemanha, Suíça, Inglaterra, França, Itália, África do Sul, Costa Rica, Estados Unidos e Canadá. Nos EUA, aproximadamente 90% do gado de leite é soropositivo. Na Holanda, 6,4% dos animais com diarreia eram positivos para o BRV, enquanto apenas 1,7% de assintomáticos foram positivos. Existem dois sorotipos do vírus, o BRV-1 e o BRV-2. Vacas assintomáticas provavelmente servem de reservatórios do vírus. O torovírus bovino (BToV) é uma espécie de vírus distinta do BRV e tem sido detectado em secreções nasais, embora não cause doença.

7 Coronavírus humanos

Os coronavírus humanos (HCoV) são responsáveis por 15-20% dos resfriados comuns que afetam a população. As cepas HCoV-229E e HCoV-OC43 são freqüentemente envolvidas, embora exista uma variabilidade antigênica muito grande entre os isolados desses vírus. Os surtos ocorrem principalmente no inverno, com um período de incubação que varia entre dois e quatro dias. Alguns dos sinais clínicos observados são: febre, dor de cabeça, dor de garganta, descarga nasal e tosse. Os indivíduos infectados são suscetíveis a reinfecções com o mesmo vírus ou com outro antigenicamente diferente. Esta segunda infecção pode resultar em sintomatologia semelhante à primeira ou em uma forma mais branda.

Um novo coronavírus humano – denominado SARS-CoV – altamente patogênico foi isolado recentemente de pacientes com uma síndrome denominada pneumonia asiática (SARS, *severe acute respiratory disease*). A enfermidade foi inicialmente detectada na China, em novembro de 2002. O vírus disseminou-se, posteriormente, pela Ásia, por alguns países europeus e pelo Canadá, infectando mais de 8.000 pessoas e matando 774.

O último caso foi descrito em abril de 2004. As pessoas afetadas apresentavam febre, cefaléia, dispnéia e evidência radiológica de pneumonia. O vírus associado com essa doença era diferente de todas as espécies de coronavírus conhecidas até então. Estudos epidemiológicos e moleculares demonstraram que o vírus teve origem em um animal silvestre e adaptou-se à espécie humana. O hospedeiro natural do vírus ainda não foi determinado, mas os candidatos mais prováveis são o *masked palm civet cat* e o *racoon dog*, ambas espécies típicas da China. Foi também sugerido que o gato civet teria servido somente de hospedeiro intermediário, no qual o vírus foi amplificado, e não como o reservatório original do vírus. Recentemente um coronavírus foi identificado em morcegos, com grande homologia com o da SARS, sugerindo que essa possa ser a origem do vírus da SARS. A pneumonia asiática foi rapidamente controlada graças ao trabalho desenvolvido por uma rede de profissionais em todos os locais onde houve a ocorrência da infecção, interconectados através da Organização Mundial de Saúde (OMS – WHO).

8 Bibliografia consultada

- ADDIE, D.D. et al. Second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. **J. Feline Med. Surg.**, v.6, n.2, p.125-130, 2004.
- ADDIE, D.D. et al. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. **J. Gen. Virol.**, v.84, n10, p.2735-2744, 2003.
- ANIMAS S.B. et al. Experimental infection with avian infectious bronchitis virus (Kagoshima-34 strain) in chicks at different ages. **J. Vet. Med. Sci.**, v.56, n.3, p.443-447, 1994.
- BANDAI, C.S. et al. Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. **J. Vet. Med. Sci.**, v.61, p.731-736, 1999.
- BATTILANI, M. et al. Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.28, n.39 p.141-147, 2003.
- BENETKA, V. et al. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. **Vet Microbiol.**, v.26, n.99, p.31-42, 2004.

- BINN, L.N. et al. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. **Proc. Ann. Meeting US An. Health Assoc.**, v.78, p.359-366, 1974.
- BRANDÃO, P.E. et al. **Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil.** Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v. 69, n. 2, p.103-104, 2002.
- BRIAN, D.A.; BARIC, R.S. Coronavirus genome structure and replication. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.287, p1-30, 2005.
- COX, E. et al. Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus. **Vaccine**, v.11, n.2, p.267-272, 1993.
- Büchen-Osmond, C. Família Coronaviridae. In: **International Committee on taxonomy of viruses**, Oracle, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/19000000.htm>. Acesso em: 18 set. 2006.
- CROUCH, C.F. et al. Lactogenic immunity following vaccination of cattle with bovine coronavirus. **Vaccine**, v.19, n.2-3, p.189-196, 2000.
- DECARO N. et al. Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.11, n.1, p.102-105, 2004.
- DEZENGRINI, R. Soroprevalência de infecções víricas em cães de Santa Maria, RS; e seleção e caracterização de linhagens celulares resistentes ao vírus da diarreia viral bovina. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic virology, a practitioner's guide**. St Louis: Mosby Year Book, 1992. 285p.
- ERLES, K. et al. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**, v.310, p.216-223, 2003.
- GALLAGHER, T.M.; BUCHMEIER, M.J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v.279, n.2, p.371-374, 2001.
- GONON, V. et al. Clearance of infection in cats naturally infected with feline coronaviruses is associated with an anti-S glycoprotein antibody response. **J. Gen. Virol.**, n.9, p.2315-2317, 1999.
- GREEN, J.S. et al. Serologic response of captive coyotes (*Canis latrans Say*) to canine parvovirus and accompanying profiles of canine coronavirus titers. **J. Wildl. Dis.**, v.20, n.1, p.6-11, 1984.
- GUNN-MOORE, D.A. et al. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. **Vet. Microbiol.**, v.62, n.3, p193-205, 1998.
- HAIJEMA, B.J. et al. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. **J. Virol.**, v.78, n.8, p.3863-3871, 2004.
- HASOKSUZ, M. et al. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. **Acta Vet. Hung.**, v.53, n.1, p.137-146, 2005.
- HERREWEGH, A.A. et al. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.3, p.684-689, 1995.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary microbiology**. Massachusetts: Blacwell Science, 1999.
- KANESHIMA, T. The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v.68, n.1, p.21-25, 2006.
- IGNJATOVIC, J.; SAPATS, S. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.**, v.150, n.9, p.1813-1831, 2005.
- IGNJATOVIC, J. et al. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. **J. Comp. Pathol.**, v.126, n.2-3, p.115-123, 2002.
- IGNJATOVIC J.; SAPATS, S. Avian infectious bronchitis virus. **Rev. Sci. Tech.**, v.19, n.2, p.493-508, 2000.
- JABRANE, A. et al. Pathogenicity of porcine respiratory coronavirus isolated in Quebec. **Can. Vet. J.**, v.35, n.2, p.86-92, 1994.
- JEONG, J.H. et al. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. **J. Vet. Med. Sci.**, v.67, n.2, p.187-189, 2005.
- JEREZ, J.A. et al. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v. 69, n. 2, p.19-23, 2002.
- KAPIL, S. et al. Cellular immune status of coronavirus-infected neonatal calves. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.17, n.2, p.133-138, 1994.
- KEENAN, K.P. et al. Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71: studies by virologic, histologic, histochemical, and immunofluorescent techniques. **Am J Vet Res.**, v.37, n.3, 247-56, 1976.
- KENNEDY, M. et al. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. **Vet. Microbiol.**, v.8, n.81, p.227-234, 2001.
- KISS, I. et al. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. **Vet. J.**, v.159, n.1, p.64-70, 2000.

- KNIPE et al. *Fields Virology*. 4. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
- LAU S.K. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.27, n.102, p.140-145, 2005.
- LIU, L. et al. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n.3, p.957-960, 2006.
- MURPHY, F.A. et al. *Veterinary virology*. 3. ed. San Diego: Academic, 1999. 629p.
- NAYLOR, M.J. et al. Canine coronavirus in Australian dogs. *Austr. Vet. J.*, v.79, p.116-119, 2001.
- PEI, J. et al. Memory T cells protect chicks from acute infectious bronchitis virus infection. *Virology*. v.306, n.2, p.376-384, 2003.
- PENSAERT, M.B. Porcine epidemic diarrhea. In: STRAW, B.E. et al. *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University, 1999. Cap.16, p.179-185.
- PRATELLI, A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis, *Veterinary Research*, v.37, p.191-200, 2006.
- PRATELLI, A. et al. Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. *Journal of Virological Methods*, v.102, p.67-71, 2002.
- ROTTIER, P.J.M. The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Vet. Microbiol.*, v.69, n.1-2, p.117-125, 1999.
- SAIF, L.J.; WESLEY, R.D. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. In: STRAW, B.E. et al. *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University, 1999. Cap.24, p.295-324.
- SAIF, L.J. Mucosal immunity: an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.54, n.1-4, p.163-169, 1996.
- SAIF, L.J. et al. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, n.7, p.1426-1432, 1986.
- SOBESTIANSKY, J. et al. *Clínica e patologia suína*. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1999. 464 p.
- STORZ, J. et al. Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetylcholinesterase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains. *Arch. Virol.*, v.125, n.1-4, p.193-204, 1992.
- TENNANT B.J., et al. Studies on the survival of canine coronavirus under different environmental conditions. *Vet Microbiol.*, v.42, n.2-3, p.255-259, 1994.
- TENNANT, B.J. et al. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res. Vet. Sci.*, v.51, n.1, p.11-18, 1991.
- TIMONEY, J.F. et al. *Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals*. 8. ed. Ithaca: Cornell University, 1988. 951p.
- TRAVEN, M. et al. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV - comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet. Microbiol.*, v.81, n.2, p.127-151, 2001.
- VENNEMA, H. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Vet. Microbiol.*, v.69, n. 1-2, p.139-141, 1999.
- VENNEMA, H. et al. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, v.30, n.243, p.150-157, 1998.
- WESLEY, R.D.; WOODS, R.D. Induction of protective immunity against transmissible gastroenteritis virus after exposure of neonatal pigs to porcine respiratory coronavirus. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, n.2, p.157-162, 1996.
- WESLEY, R.D.; LAGER, K.M. Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with porcine respiratory coronavirus (PRCV). *Vet. Microbiol.*, v.1, n.95, p.175-186, 2003.
- WESLEY, R.D. The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus. *Virus Res.*, v.61, n.2, p.145-152, 1999.
- YESILBAG, K. et al. Canine coronavirus infection in Turkish dog population. *J. Vet. Med.*, v.51, p.353-355, 2004.
- ZHANG, X. et al. Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. *Arch Virol.*, v.134, n.3-4, p.421-426, 1994.

1 Introdução	641
2 Classificação	641
3 Propriedades dos vírions, estrutura e organização genômica	641
4 Ciclo replicativo	643
4.1 Adsorção e penetração	643
4.2 Replicação do genoma	644
4.3 Produção de RNAs mensageiros subgenômicos	644
4.4 Tradução e processamento das proteínas	645
4.5 Morfogênese e egresso	645
5 Arterivírus de importância veterinária	646
5.1 Vírus da arterite eqüina	646
5.1.1 Epidemiologia	646
5.1.2 Patogenia e sinais clínicos	647
5.1.3 Patologia	648
5.1.4 Imunidade	648
5.1.5 Diagnóstico	648
5.1.6 Controle e profilaxia	649
5.2 Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos	649
5.2.1 Epidemiologia	650
5.2.2 Patogenia e sinais clínicos	651
5.2.3 Imunidade	652
5.2.4 Diagnóstico	652
5.2.5 Controle e profilaxia	653
6 Perspectivas	654
7 Bibliografia consultada	654

1 Introdução

Durante a década de 1990, semelhanças na estrutura e morfologia dos vírions, na sequência de nucleotídeos e organização genômica, além de propriedades biológicas em comum, levaram o vírus da arterite eqüina (EAV), o vírus elevador da lactato-desidrogenase (LDEV), o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) e o vírus da febre hemorrágica dos símios (SHFV) a serem agrupados em uma nova família viral, a *Arteriviridae*. O nome da família foi derivado da doença causada pelo EAV em eqüinos. Acredita-se que exista uma ligação evolutiva entre os arterivírus e os membros da família *Coronaviridae*, apesar de diferenças marcantes estruturais, genômicas e biológicas. Essa relação é decorrente de semelhanças existentes nos genes que codificam as enzimas do complexo replicase e também devido à utilização de estratégias similares de expressão gênica.

Os arterivírus compartilham diversas propriedades biológicas e moleculares, são restritos aos seus hospedeiros naturais e possuem a capacidade de causar infecções persistentes assintomáticas em hospedeiros susceptíveis (Tabela 25.1). Além disso, a produção de um grupo de RNAs mensageiros subgenômicos (mRNAsg) que, posteriormente, são traduzidos em proteínas estruturais, constitui-se em uma propriedade única dos arterivírus e coronavírus e serviu como base para a criação da ordem *Nidovirales* (do latim; *nido* = ninho).

2 Classificação

Ordem: *Nidovirales*
Família: *Arteriviridae*
Gênero: *Arterivirus*

Espécies: vírus da arterite eqüina (EAV), vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV), vírus elevador da lactato desidrogenase (LDEV), vírus da febre hemorrágica dos símios (SHFV).

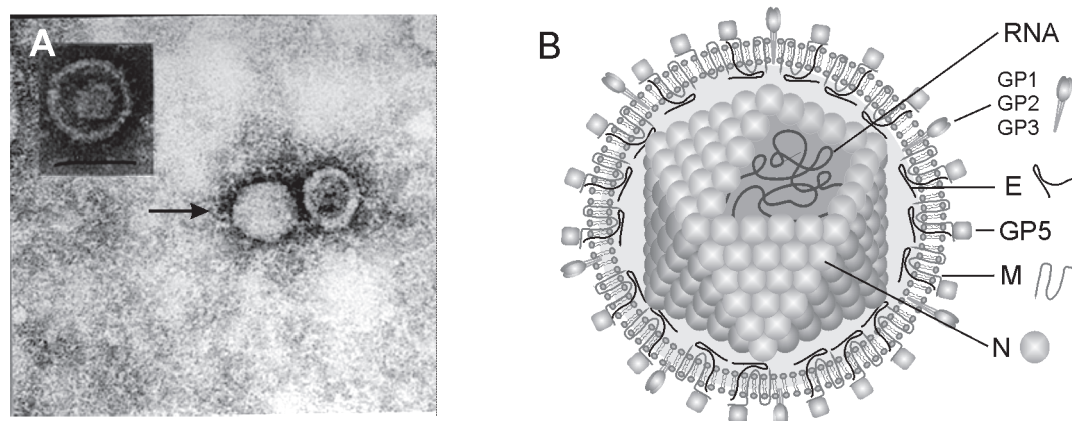
3 Propriedades dos vírions, estrutura e organização genômica

Os membros da família *Arteriviridae* possuem vírions relativamente pequenos (45-60 nm de diâmetro), esféricos e com superfície aproximadamente regular. Possuem um nucleocapsídeo possivelmente icosaédrico, com diâmetro entre 25 e 35 nm, envolto por um envelope lipoprotéico com pequenas projeções (Figura 25.1). Os vírions perdem a infectividade rapidamente quando expostos a temperaturas $\geq 4^{\circ}\text{C}$ e são instáveis em soluções com baixas concentrações de detergentes não-iônicos ou com pH abaixo de 6 ou acima de 7.5.

O genoma consiste de uma molécula linear de RNA, fita simples, de sentido positivo, com aproximadamente 13-15 kb. A organização genômica é muito similar entre os membros da família *Arteriviridae*. O RNA viral é infeccioso quando

Tabela 25.1. Doenças animais associadas com infecções por arterivírus.

Vírus	Hospedeiro	Consequências da infecção
EAV	Eqüinos	Infecções persistentes em garanhões, artrite, abortamentos, pneumonia em potros
PRRSV	Suínos	Infecções subclínicas, enfermidade respiratória e distúrbios reprodutivos
LDEV	Camundongos	Infecções subclínicas em colônias de camundongos
SHF	Macacos	Doença sistêmica, hemorragias e morte



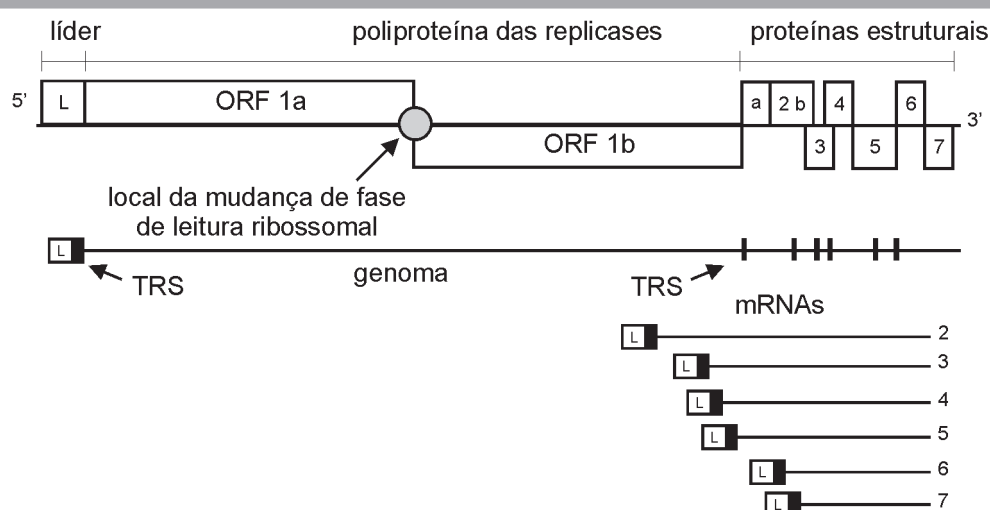
Fonte: A) Dr. D. Robinson, South Dakota State University, EUA.

Figura 25.1. Estrutura dos vírions da família *Arteriviridae*. A) Microscopia eletrônica mostrando uma partícula viral completa (seta) do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) e outra incompleta (ausência do nucleocapsídeo); B) Ilustração da estrutura do vírion do PRSSV. Variações na nomenclatura das proteínas e/ou proteínas adicionais podem ser encontradas em outros membros da família.

introduzido artificialmente em células permissivas, possui uma estrutura *cap* na extremidade 5' e uma cauda de poli-A na extremidade 3'.

Uma representação esquemática da estrutura e organização do genoma dos arterivírus está apresentada na Figura 25.2. As proteínas não-estruturais são traduzidas pela tradução das ORFs (*open reading frames*) 1a e 1b que abrangem cerca de 80% do genoma policistrônico dos arterivírus. A ORF1a é extremamente variável, enquanto a

ORF1b possui um alto nível de conservação entre todos os arterivírus. As outras ORFs, localizadas na extremidade 3' do genoma, codificam proteínas estruturais que permanecem associadas como componentes dos vírions. Essas proteínas são produzidas pela tradução de um grupo de RNA mensageiros subgenômicos (mRNAsg), que, por sua vez, são produzidos pela transcrição da cópia de RNA de sentido antígeno.



Fonte: adaptado de Snijder & Meulenberg (2001).

Figura 25.2. Estrutura e organização genômica dos arterivírus. As ORFs 1a e 1b codificam as proteínas não-estruturais (NS), entre as quais as enzimas do complexo replicase. Essas proteínas são produzidas pela tradução direta do genoma de polaridade positiva. As proteínas estruturais são produzidas pela tradução de RNAs mensageiros subgenômicos (mRNAsg), numerados de 1 a 7. O RNA genômico e os mRNAsg possuem a mesma região líder 5' (L).

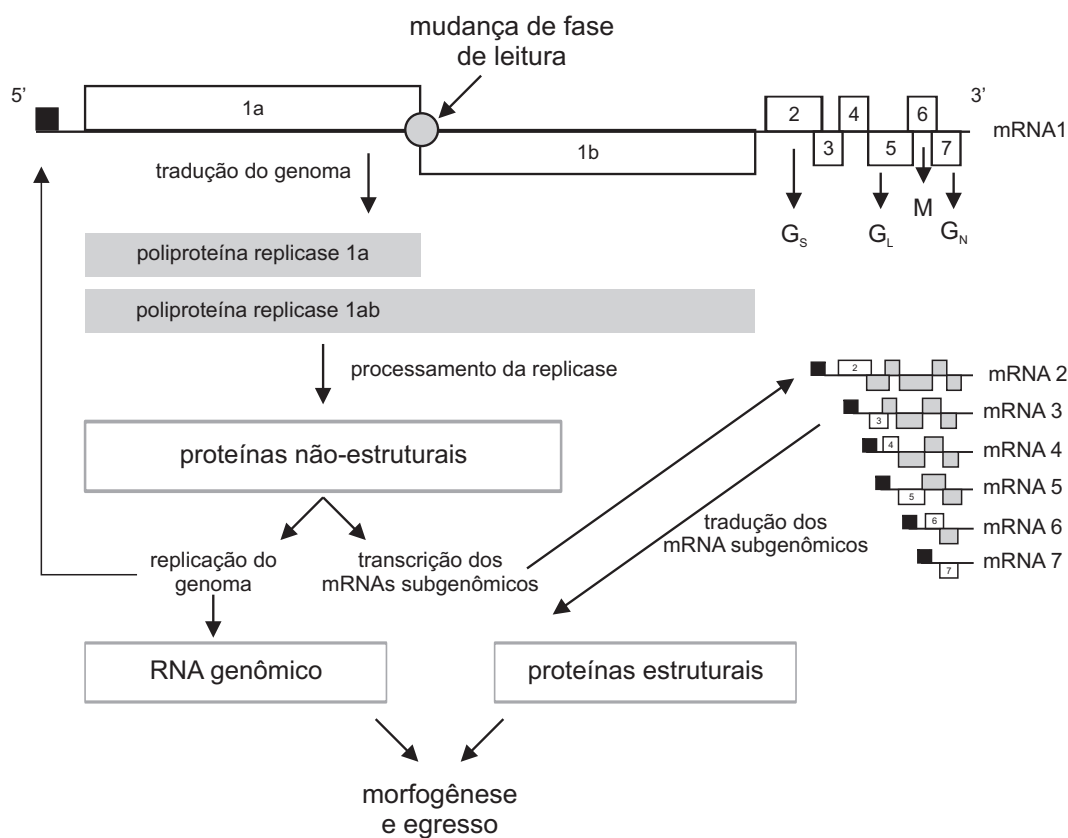
4 Ciclo replicativo

Os arterivírus replicam eficientemente em cultivos primários de macrófagos de seus hospedeiros naturais. O SHFV e o PRRSV replicam também em células da linhagem MA-104 e suas derivadas (MARC-145). Além disso, diversas outras linhagens celulares são permissivas à replicação do EAV. O ciclo de replicação é relativamente curto e títulos superiores a 10^8 DICC₅₀ (dose infectiva para 50% dos cultivos celulares) são facilmente observados no sobrenadante de células infectadas com o EAV e com o SHFV. O

efeito citopático durante a infecção de células de cultivo caracteriza-se por arredondamento celular e desprendimento das células infectadas da superfície dos frascos de cultivo. As principais etapas do ciclo replicativo estão representadas na Figura 25.3.

4.1 Adsorção e penetração

A replicação dos arterivírus ocorre na região perinuclear do citoplasma das células hospedeiras. *In vivo*, os principais alvos de replicação são células da linhagem macrofágica. *In vitro*, repli-



Adaptado de Snijder & Meulenberg (2001).

Figura 25.3. Etapas da expressão gênica e replicação do genoma dos arterivírus (EAV). Após a penetração e desnudamento, a primeira etapa é a tradução direta das ORFs 1a e 1b, resultando na produção de duas poliproteínas (replicase 1a e replicase 1ab), que serão clivadas originando as enzimas do complexo replicase (proteínas NS). Essas enzimas realizam a transcrição integral do genoma, originando uma cópia de sentido antígenômico (polaridade negativa). Utilizando esta molécula como molde, o complexo replicase transcreve regiões próximas à extremidade 3', resultando na produção de vários mRNAsg que codificam as proteínas estruturais. A transcrição integral da cópia antígenômica resulta na produção de RNAs com a extensão genômica, que, juntamente com as proteínas estruturais, irão participar da morfogênese da progênie viral. Note que para o EAV, os produtos das ORFs 2a e 2b denominam-se proteínas E e GS, respectivamente, enquanto a ORF5 codifica a GL ou gp5.

cação produtiva em linhagens celulares não-susceptíveis à infecção natural pode ser produzida por transfecção do RNA genômico. A adsorção dos vírions à superfície das células hospedeiras ocorre provavelmente pela interação da glicoproteína 5 (gp5) ou do dímero gp5/M com uma proteína de 210 kDa, localizada na membrana plasmática de macrófagos alveolares. Em células MARC-145, uma molécula de superfície, com características similares à heparina, poderia servir de receptor para o PRRSV. A penetração do vírus na célula hospedeira ocorre por endocitose mediada por receptor, e a fusão do envelope com a membrana plasmática é dependente da redução de pH que ocorre nos endossomos.

4.2 Replicação do genoma

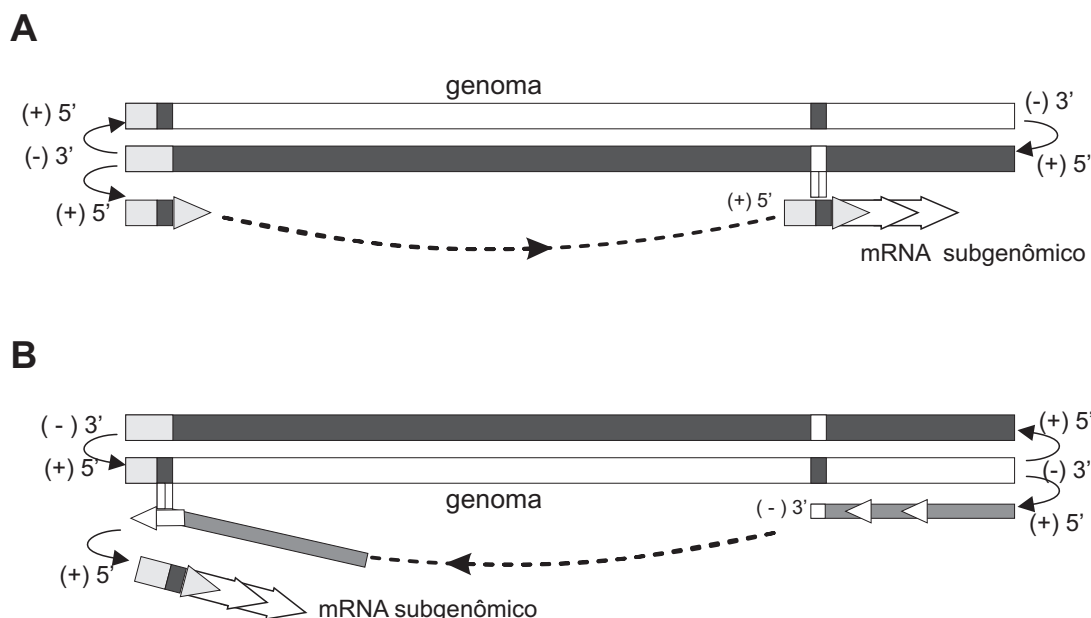
A replicação do genoma dos arterivírus ocorre integralmente no citoplasma e envolve a síntese de uma molécula de RNA de sentido antígenômico (polaridade negativa). Essa molécula serve de molde para a síntese de mRNAsg para a produção das proteínas estruturais e para a síntese de cópias de extensão e sentido genômico. O complexo replicase é responsável pela produ-

ção das moléculas de sentido antígenômico, pela produção dos mRNAsg e pela síntese das cópias de sentido genômico. As enzimas do complexo replicase são produzidas em etapas iniciais do ciclo, pela tradução direta das ORFs 1a e 1b.

Com exceção de pequenas seqüências não-traduzidas, localizadas próximas às extremidades 5' (156 a 221 nucleotídeos) e 3' (59 a 117 nt), que provavelmente contêm sinais importantes para a replicação e tradução do genoma viral, as demais regiões genômicas são codificantes.

4.3 Produção de RNAs mensageiros subgenômicos

A expressão dos genes presentes no terço 3' do genoma ocorre pela tradução de um grupo de RNA mensageiros subgenômicos (mRNAsg). Este mecanismo se constitui em uma característica única do ciclo replicativo dos membros da ordem *Nidovirales*. Os mRNAsg são sintetizados por um mecanismo de transcrição muito similar ao que foi proposto para os coronavírus. Os modelos propostos para a síntese de mRNAsg estão apresentados na Figura 25.4. Todos os mRNAsg possuem uma seqüência *leader* na extremidade 5'



Adaptado de Snijder & Meulenber (2001).

Figura 25.4. Modelos propostos para a síntese de RNAs mensageiros subgenômicos (mRNAsg). A) Transcrição a partir da molécula de RNA antígenômico (sentido negativo); B) Transcrição a partir do RNA genômico (sentido positivo), originando RNAsg subgenômicos que serviriam de molde para a síntese dos mRNAsg correspondentes.

– derivada da extremidade equivalente do genoma viral – fusionada ao RNA mensageiro através de um mecanismo de transcrição descontínua, além de pequenas seqüências conservadas envolvidas na regulação da transcrição (TRS) na extremidade 3'. Atualmente, evidências indicam que o modelo de transcrição mais consistente seria a geração de mRNAsg, através de um mecanismo de síntese descontínua a partir do RNA genômico. De acordo com este modelo, poderia ocorrer tanto a geração de mRNAsg de sentido negativo (síntese descontínua), como de RNA antigenômico (síntese contínua). Em uma etapa subsequente, os RNAsg de sentido negativo seriam transcritos em moléculas de sentido positivo (mRNAsg), que seriam, posteriormente, traduzidas em proteínas estruturais, enquanto o RNA antigenômico (sentido negativo) serviria de molde para a síntese de RNA genômico.

4.4 Tradução e processamento das proteínas

As proteínas que formam o complexo replicase são produzidas pela tradução direta do RNA genômico a partir das ORFs 1a e 1b (Figura 25.3). A tradução da ORF1b envolve um mecanismo denominado *-1 ribosomal frameshift*, ou seja, em um determinado ponto, ao final da tradução da ORF1a, os ribossomos mudam de fase de leitura (voltam 1 nucleotídeo) e passam a traduzir a ORF1b em uma diferente fase. A ORF1a é traduzida em uma poliproteína que é, posteriormente, clivada, originando oito polipeptídeos não-estruturais (Nsp1 a Nsp8). No EAV, a Nsp1, Nsp2 e Nsp4 possuem atividade proteolítica, sendo responsáveis pelo processamento de outras Nsps. Também foi demonstrada a presença de, pelo menos, uma protease adicional para o LDEV e PRRSV e, possivelmente, duas para o SHFV. A clivagem proteolítica da poliproteína resultante da tradução da ORF1b resulta nos polipeptídeos Nsp10 a Nsp12. Um pequeno segmento N-terminal da Nsp9 é codificado por códons finais da ORF1a, enquanto grande parte desta proteína é codificada pela proximal da ORF1b. As regiões com atividade de RNA polimerase e NTPase/RNA helicase – que formam o complexo replicase – estão associadas com a Nsp9 e Nsp10, respectivamente.

De um modo geral, os arterivírus possuem seis ou sete proteínas componentes do envelope viral. O genoma do SHFV pode conter uma duplicação ou inserção na extremidade proximal 3', resultando em ORFs adicionais que codificam outras glicoproteínas. As três principais proteínas estruturais, produtos das ORFs 5, 6 e 7 (PRRSV, EAV e LDV), são codificadas a partir de mRNAsg transcritos a partir da região 3' do genoma. A proteína M (produto da ORF6) é uma proteína integral de membrana, não glicosilada, sendo a proteína estrutural mais conservada dos arterivírus. Após a sua síntese, a proteína M acumula-se no retículo endoplasmático das células infectadas, onde interage com a principal glicoproteína do envelope viral (gp5), formando heterodímeros. Estes heterodímeros irão se localizar no envelope e são essenciais para a infectividade viral. A proteína N é pequena (12-15 kDa), interage com o RNA genômico durante a formação do nucleocapsídeo e constitui aproximadamente 20 a 40% da massa protéica dos vírions.

O produto das ORFs 2, 3 e 4 são proteínas integrais de membrana clássicas do tipo I e possuem uma importância relativamente menor em comparação com as outras proteínas estruturais. Além disso, não existe um consenso sobre a presença da gp3 como componente dos vírions em cepas norte-americanas do PRRSV. Embora as funções específicas de cada uma das proteínas estruturais dos arterivírus não tenham sido completamente elucidadas, evidências indicam que, aparentemente, todas as proteínas exercem funções essenciais para a replicação e produção de progênie viral viável.

4.5 Morfogênese e egresso

A primeira etapa da morfogênese envolve a associação do genoma RNA com múltiplas cópias da proteína N, formando o nucleocapsídeo. A etapa seguinte envolve a interação dos nucleocapsídeos com as caudas das glicoproteínas do envelope e a conseqüente aquisição do envelope. Os arterivírus adquirem o envelope pelo brotamento de nucleocapsídeos pré-formados para o interior do retículo endoplasmático liso ou do complexo de Golgi. Após a sua síntese, as proteínas estruturais que participam da forma-

ção do envelope viral encontram-se retidas em membranas intracelulares. As partículas víricas, formadas pelo brotamento dos nucleocapsídeos em membranas do retículo endoplasmático ou do Golgi, acumulam-se em vesículas intracelulares, no interior das quais são transportados até a membrana plasmática. A liberação da progênie viral para o espaço extracelular ocorre por exocitose, pela fusão dessas vesículas com a membrana plasmática.

5 Arterivírus de importância veterinária

5.1 Vírus da arterite eqüina

A arterite viral eqüina (EVA) é uma doença infecto-contagiosa de eqüinos, causada por um membro da família *Arteriviridae*, denominado vírus da arterite eqüina (*equine arteritis virus*, EAV). A denominação da doença se deve à característica inflamatória das lesões produzidas pelo vírus no endotélio dos vasos sanguíneos, especialmente nas arteríolas. A infecção pelo EAV frequentemente se manifesta de forma subclínica ou com sinais leves, mas também pode resultar em sinais respiratórios em eqüinos adultos, abortamento em éguas e em pneumonia intersticial em neonatos. Apesar da existência de diferenças antigênicas entre isolados de campo, apenas um sorotipo do EAV é reconhecido.

A infecção pelo EAV pode ocasionar grandes prejuízos econômicos para a eqüideocultura, tanto pelas perdas reprodutivas como pela redução na performance de animais de esporte e competição. Os prejuízos geralmente se devem a: a) surtos de aborto e/ou morte de potros neonatos; b) redução no valor comercial de garanhões infectados e na demanda reprodutiva desses animais; c) recusa do mercado internacional a garanhões e sêmen de garanhões portadores, e no caso de alguns países, de qualquer animal soropositivo; e d) alterações nos programas de treinamento e redução ou cancelamento de corridas em casos de surtos de EVA em hipódromos.

5.1.1 Epidemiologia

O primeiro isolamento do EAV foi realizado, em 1953, nos Estados Unidos, a partir do pulmão de um feto abortado no estado de Ohio. A partir de então, a infecção tem sido detectada em populações eqüinas de todo o mundo, demonstrando a ampla disseminação do agente. Nos últimos 10 a 15 anos, tem sido observado um aumento no número de surtos de EVA nos Estados Unidos e na Europa. O isolamento recente do vírus na Argentina e a detecção de sorologia positiva nos estados de São Paulo (18,2%) e Rio Grande do Sul (2,2%) confirmam a circulação do vírus na América do Sul. O aumento do comércio internacional de animais e sêmen eqüino podem ter contribuído para a disseminação do EAV na população eqüina desses países.

A transmissão do EAV pode ocorrer por secreções e excreções de animais infectados ou ainda por aerossóis, fômites, água e alimentos contaminados. A excreção do vírus nas secreções e excreções de animais na fase aguda da infecção ocorre por um período curto, que geralmente não excede 16 dias. A transmissão por aerossóis constitui-se na principal forma de disseminação do EAV, tanto nas propriedades destinadas à reprodução como em locais com grande aglomeração e contato entre os animais. Outra via importante de transmissão do vírus é a venérea. Trata-se de uma forma muito efetiva de transmissão, pois cerca de 85 a 100% das éguas cobertas por garanhões portadores ou inseminadas com sêmen contaminado se infectam. A transmissão congênita também pode ocorrer, resultando em abortamento ou no nascimento de potros infectados. Nesses casos, os tecidos fetais e a placenta são considerados importantes fontes da infecção, pois contêm grande quantidade de vírus.

A transmissão pelo sêmen possui grande importância epidemiológica. Estima-se que entre 30 e 60% dos garanhões infectados tornam-se persistentemente infectados e excretam o vírus por longos períodos. O vírus pode persistir no garanhão por semanas, meses ou anos e, em alguns casos, até por toda a vida. Entretanto, uma

porcentagem variável de garanhões portadores erradica o vírus espontaneamente do seu trato reprodutivo. O estabelecimento e a manutenção da persistência viral parecem ser dependentes de testosterona. Assim, machos castrados conseguem erradicar completamente o agente dos tecidos cerca de 2 a 3 semanas após a infecção.

5.1.2 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia da infecção pelo EAV foi estudada com base na detecção de antígenos virais e na distribuição das lesões produzidas pelo agente. A penetração do vírus geralmente ocorre pela via respiratória ou oral. Inicialmente o vírus replica no epitélio respiratório e em macrófagos alveolares. Após a replicação inicial, o vírus atinge os linfonodos regionais, especialmente os bronquiais. Por volta do terceiro dia após a infecção, o vírus replica nos linfonodos bronco-pulmonares, no endotélio dos vasos pulmonares e em monócitos circulantes, tendo acesso à circulação sangüínea, através da qual se dissemina pelo organismo. Subseqüentemente, ocorre a replicação no endotélio de um grande número de vasos sangüíneos. Passados aproximadamente 10 dias de infecção, a detecção de antígenos virais é bastante reduzida na maioria dos tecidos previamente afetados, com exceção da túnica média das artérias musculares. Aparentemente, o último sítio de invasão viral é o epitélio tubular renal, onde o vírus pode persistir por um período adicional de duas semanas. As manifestações clínicas da enfermidade são decorrentes das lesões produzidas nos endotélios vasculares e do aumento da permeabilidade vascular, por causa da liberação de citocinas vasoativas e mediadores inflamatórios. Além das alterações inflamatórias, os danos ao endotélio podem induzir anóxia ou trombose.

A patogenia da forma abortiva da enfermidade ainda não está completamente elucidada. Especula-se que o aborto ocorra devido a uma miometrite provocada pela replicação viral. A compressão dos vasos sangüíneos pelo edema endometrial e/ou alterações no tônus vascular pela liberação de mediadores inflamatórios promovem uma redução no fluxo sangüíneo para o feto. Além disso, há uma redução dos níveis de

progesterona entre 6 e 48 horas que antecedem o aborto. Esta redução, combinada com a liberação local de prostaglandinas, pode levar ao descolamento da membrana coriônica e expulsão do feto.

A maioria das infecções naturais pelo EAV são subclínicas e passam, portanto, despercebidas. No entanto, alguns animais desenvolvem sinais clínicos, tais como: descarga nasal mucopurulenta, lacrimejamento, conjuntivite, edema palpebral, escrotal e da glândula mamária, e, em quadros mais graves, edema pulmonar. Além disso, em alguns casos, podem ser evidenciados sinais inespecíficos, como: tosse, apatia, anorexia, diarreia e cólicas. Em geral, a severidade da EVA é maior em animais jovens ou muito velhos; em animais debilitados e naqueles sob estresse físico muito grande. É importante salientar que, com poucas exceções, a maioria dos animais afetados se recupera espontaneamente da enfermidade. Portanto, a mortalidade é muito baixa e, na maioria das vezes, ocorre somente em neonatos infectados intra-uterinamente. Esses neonatos geralmente vão a óbito devido a quadros fulminantes de pneumonia intersticial, que se manifestam entre 48 e 96 horas após o nascimento.

Apesar da ocorrência de doença respiratória, os maiores prejuízos causados pela infecção devem-se principalmente às perdas reprodutivas. Os abortamentos ocorrem geralmente por causa de uma miometrite necrotizante grave, sem infecção fetal concomitante, mas com a presença de grande quantidade de vírus. Os abortamentos podem ocorrer com ou sem sinais respiratórios e/ou vasculares prévios. Geralmente os abortos ocorrem entre 7 a 14 dias após o início dos sinais clínicos, diferindo de abortamentos em fases tardias, como aqueles que ocorrem na rinopneumonia eqüina. As éguas que abortam parecem não sofrer nenhum efeito adverso com relação à fertilidade.

Em contraste, garanhões afetados pela EVA podem passar por um período curto de redução de fertilidade. Acredita-se que este quadro transitório deva-se ao aumento da temperatura testicular, que é associado com a resposta inflamatória local. Além disso, os garanhões afetados frequentemente apresentam diminuição da libido, da

concentração e da motilidade espermática, além de apresentarem patologia espermática elevada. Essas alterações podem persistir por períodos de até 17 semanas. A persistência do vírus no trato reprodutivo de animais cronicamente infectados não parece provocar essas alterações e estes animais são portadores assintomáticos do agente.

5.1.3 Patologia

Os isolados do EAV diferem na virulência, na capacidade de induzir lesões e na severidade das lesões. As lesões macroscópicas são o resultado das alterações vasculares provocadas pela replicação viral. Edema, congestão e hemorragias do tecido subcutâneo nos linfonodos e vísceras são os achados mais freqüentes. As cavidades corporais podem conter quantidade moderada ou abundante de exsudato amarelado; e os pulmões, especialmente dos neonatos, encontram-se edemaciados e contêm grande quantidade de líquido. Em alguns casos, áreas multifocais ou difusas de coloração avermelhada podem ser observadas nos pulmões, por causa de congestão e hemorragia. O endométrio de éguas que abortaram pode se apresentar edemaciado, congesto e, algumas vezes, com hemorragias.

As alterações histológicas são observadas em vários sistemas, porém a parede dos vasos são os locais mais afetados. As lesões mais brandas incluem edema vascular e perivascular, com hipertrofia das células endoteliais. Nos casos mais severos, observa-se vasculite e necrose fibrinóide da túnica média, infiltrado linfocítico abundante, freqüente perda do endotélio e formação de trombos. Os pulmões podem apresentar pneumonia intersticial de grau leve a severo, caracterizada por infiltração alveolar de macrófagos, em menor número de neutrófilos e formação de membrana hialina. Além disso, ocorre hipertrofia e hiperplasia dos pneumócitos, arterite e flebite nos vasos pulmonares.

As lesões renais, que podem ser severas, ocorrem em fases avançadas da infecção e se caracterizam por necrose tubular, nefrite intersticial, desorganização glomerular e hiperplasia celular. As lesões no epitélio do trato reprodutivo

de éguas que abortaram incluem edema, infiltração de macrófagos e neutrófilos, presença de grandes fagolisossomos contendo material denso. O miométrio pode conter miócitos necróticos com aglomeração de ribossomos, macrófagos e edema. No trato reprodutivo do macho, as lesões são caracterizadas por vasculite necrosante envolvendo os testículos, o epidídimo, os ductos deferentes, as ampolas, a próstata, as glândulas vesiculares e bulbouretrais.

5.1.4 Imunidade

Infecções naturais ou experimentais com o EAV resultam em imunidade duradoura contra reinfecções com diferentes cepas do vírus. Anticorpos com atividade neutralizante podem ser detectados entre 7 e 14 dias pós-infecção (dpi), coincidindo com o desaparecimento do vírus da circulação sangüínea. Altos títulos neutralizantes são geralmente detectados em animais com infecção persistente. A excreção viral pelo sêmen ocorre mesmo na presença de títulos altos de anticorpos neutralizantes, indicando que a imunidade humoral não é suficiente para prevenir a replicação viral no trato reprodutivo dos machos. Os potros nascidos de fêmeas imunes são protegidos da doença clínica nas primeiras semanas de vida devido à transferência passiva de anticorpos pelo colostro.

5.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo EAV pode ser realizado pela detecção direta do agente, de antígenos ou do RNA viral em tecidos ou em secreções provenientes de animais infectados. A detecção de anticorpos específicos também pode ser utilizada. O isolamento do vírus pode ser realizado em células das linhagens RK-13, Vero ou, ainda, em cultivos primários de células pulmonares de eqüinos. As amostras a serem enviadas ao laboratório para o isolamento do vírus incluem suabes nasais e da nasofaringe ou amostras de sangue com anticoagulante. Para aumentar a probabilidade de detecção do vírus, as amostras devem ser coletadas no início da fase febril. Em

casos de aborto, o isolamento viral pode ser tentado a partir da placenta, dos fluidos fetais, pulmões, fígado e tecidos linforreticulares do feto abortado. Além do isolamento do vírus, a detecção de antígenos pela técnica de imunohistoquímica e a caracterização das lesões vasculares por exames histológicos também podem auxiliar na confirmação da etiologia. Técnicas moleculares, como a RT-PCR, também têm sido utilizadas para identificar a presença do vírus, especialmente em amostras de sêmen.

A infecção pelo EAV é freqüentemente confirmada sorologicamente pela demonstração de aumento significativo (quatro vezes ou mais) nos títulos de anticorpos contra o vírus. O teste de microneutralização na presença de complemento é amplamente utilizado, sendo um método confiável na identificação da infecção causada pelo EAV. Outros testes, como ELISA, soroneutralização e imunodifusão, também podem ser utilizados para o diagnóstico sorológico da infecção.

As manifestações clínicas reprodutivas e respiratórias causadas pelo EAV devem ser diferenciadas daquelas causadas pelos herpesvírus eqüino (EHV-1 e 4), adenovírus eqüino e influenza eqüina. Infecções bacterianas e causas não-infecciosas de abortamento também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.

5.1.6 Controle e profilaxia

Vacinas para a arterite viral eqüina ainda não estão disponíveis no mercado nacional. Apesar de a doença estar comprovadamente presente no Brasil, a vacina só poderá ser registrada e comercializada quando a doença for oficialmente reconhecida pelas autoridades sanitárias. Nos Estados Unidos e Canadá, uma vacina atenuada por passagens sucessivas em cultivo celular está disponível comercialmente, sendo recomendada para minimizar a difusão do vírus e as perdas econômicas decorrentes da infecção. Vacinas inativadas também estão comercialmente disponíveis em diversos países europeus. No entanto, apesar das atuais vacinas serem consideradas seguras e eficazes, a incapacidade de diferenciação sorológica entre animais vacinados e infectados se constitui em um dos principais obstáculos aos

programas de vigilância e controle. Entretanto, é importante salientar que os garanhões podem ser protegidos do estabelecimento da infecção persistente pela vacinação, e que os testes de diagnóstico disponíveis para a detecção do vírus no sêmen são capazes de detectar portadores com um alto grau de segurança.

A maioria das medidas de controle é direcionada para prevenir ou restringir a disseminação do EAV em criações de reprodutores na tentativa de minimizar os riscos de abortamentos, de mortalidade neonatal e o estabelecimento da infecção persistente nos garanhões. Tais medidas devem priorizar a identificação dos animais portadores e a vacinação dos reprodutores não-infectados. Os garanhões identificados como portadores devem ser manejados separadamente para evitar a transmissão do vírus para outros animais. Outro fator a ser considerado nos programas de controle é o risco a introdução do agente em rebanhos pelo sêmen contaminado. Nesse sentido, recomenda-se a utilização de sêmen proveniente de propriedades sabidamente livres do agente. Alternativamente, pode-se testar o sêmen para a presença do EAV antes de ser utilizado.

Em virtude da importância econômica da equideocultura e da constante transferência internacional de animais e de sêmen, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) impõe algumas regulamentações ao comércio internacional de eqüinos e sêmen eqüino, para prevenir a disseminação do EAV entre países. Resumidamente, as normas recomendam que todos os animais a serem comercializados e os doadores de sêmen devem possuir um certificado internacional negativo para o EAV e apregoa, ainda, a vacinação regular desde os seis meses de idade.

5.2 Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos

No final da década de 1980, surtos de uma doença até então desconhecida foram relatados simultaneamente em granjas de suínos nos estados da Carolina do Norte, Indiana, Minnessota e Iowa, nos Estados Unidos. A síndrome consistia em perdas reprodutivas, pneumonia pós-desmame em leitões, retardo no crescimento e aumen-

to nas taxas de mortalidade. Surtos, com características clínicas semelhantes, foram relatados na Europa e Ásia no início da década de 1990. A enfermidade foi inicialmente denominada *doença misteriosa dos suínos e síndrome respiratória e infertilidade suína*. A etiologia viral foi definida em 1991, e a doença ficou posteriormente conhecida como a síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS).

Atualmente, a infecção pelo PRRSV está associada com perdas econômicas significativas para a suinocultura comercial de vários países. Nos Estados Unidos, estima-se que a infecção pelo PRRSV resulte em prejuízos anuais de 560 milhões de dólares à indústria suinícola. No Brasil, um estudo sorológico e virológico, realizado entre 2003 e 2005, não demonstrou a presença da infecção pelo PRRSV em granjas de suínos. No entanto, tendo em vista a importância da suinocultura brasileira no agronegócio nacional e internacional, é indispensável um monitoramento constante dos rebanhos, assim como de animais e material genético introduzidos no país.

5.2.1 Epidemiologia

A origem do PRRSV ainda permanece indefinida. Especula-se que esse vírus possa ter se originado na Europa a partir do LDEV – um arterivírus de camundongos – e que suínos selvagens teriam servido como hospedeiros intermediários antes de o vírus adquirir a capacidade de infectar suínos domésticos. Assim, o vírus teria sido transferido para a América do Norte pela importação desses animais em 1912. Essa hipótese poderia explicar o longo período de evolução independente do vírus nos dois continentes e estaria de acordo com o momento de divergência genética a partir de um ancestral comum, estimado ter ocorrido ao redor de 1880. Entretanto, apesar de diversos estudos investigando a origem do PRRSV, ainda não existem explicações satisfatórias para a emergência quase simultânea do vírus na América do Norte e Europa.

Atualmente, acredita-se que a infecção pelo PRRSV seja endêmica na maioria dos países produtores de suínos. Evidências sorológicas indi-

cam que o PRRSV já circulava em populações suínas vários anos antes de a doença se tornar evidente e economicamente importante. Um estudo sorológico retrospectivo, em amostras coletadas no final da década de 1970 e nos anos 1980, provenientes do Canadá, Coréia, Japão e Alemanha, demonstrou a presença de anticorpos específicos contra o PRRSV. Alguns países europeus (Suécia, Suíça, Noruega, Finlândia), além de Nova Zelândia, Austrália, Brasil, Argentina e algumas áreas do Caribe, são considerados livres da infecção.

Uma análise genética de cepas de referência isoladas nos Estados Unidos e Europa demonstrou que a identidade de aminoácidos entre as sequências analisadas é inferior a 60%. Com base nessas diferenças, os isolados de PRRSV foram divididos em dois genótipos: tipo I (europeu) e tipo II (norte-americano). De um modo geral, os isolados do genótipo I são restritos ao continente Europeu, enquanto os isolados do genótipo II são encontrados nos Estados Unidos, Canadá, México e também em países asiáticos. Entretanto, isolados do genótipo II já foram identificados na Europa, apresentando um alto grau de homologia com uma vacina atenuada norte-americana introduzida no continente em 1995. Por outro lado, isolados do tipo I também já foram identificados nos Estados Unidos, porém a sua origem ainda não foi determinada.

Aparentemente, os suínos domésticos e selvagens são as únicas espécies naturalmente susceptíveis a infecção pelo PRRSV. Embora os suínos não sejam igualmente susceptíveis por todas as vias, a infecção pode ser estabelecida após inoculação por via oral, intranasal, intramuscular, intravaginal e intrauterina. Os animais infectados excretam o vírus na saliva, em secreções nasais, urina, sêmen e, possivelmente, pelas fezes. A excreção pode ocorrer simultaneamente por diferentes vias em baixos níveis ou, ainda, de forma intermitente. A difusão da enfermidade através da inseminação artificial é de grande interesse epidemiológico, pois o vírus pode ser detectado no sêmen de machos infectados mesmo na presença de anticorpos neutralizantes e na ausência de viremia. Excreção viral em secreções mamárias de fêmeas gestantes foi também demonstrada em estudos experimentais. Além disso, também exis-

te a possibilidade de transmissão do vírus através de fômites, vetores mecânicos etc.

O período que segue a exposição de animais susceptíveis ao PRRSV é caracterizado por replicação viral abundante em macrófagos alveolares e teciduais. Em fases tardias da infecção, é frequente a ocorrência de persistência viral, caracterizada por níveis baixos de replicação, principalmente em tecidos linfóides. Já foi possível se isolar o vírus de tecidos de animais experimentalmente infectados aos 157 dpi e demonstrar a presença de RNA viral em tonsilas aos 257 dpi. Dessa forma, animais com infecções persistentes assintomáticas podem se constituir em fontes de infecção para outros animais. Eventualmente o vírus parece ser completamente erradicado pelo sistema imunológico do animal persistentemente infectado e, na maioria dos casos, isso pode levar vários meses.

Já foi demonstrada a presença de vírus ou de RNA viral vários meses após a infecção. Os estudos que investigaram a viremia (apesar de diferenças entre cepas do tipo europeu e norte-americano ou entre cepas/isolados do mesmo genótipo) demonstraram viremia detectável até quatro semanas pi em animais infectados. No entanto, após esse período, as amostras podem continuar sendo positivas por PCR. Além disso, a detecção de animais carreadores pode ser problemática. Um estudo demonstrou que 54/191 suabes da orofaringe de fêmeas de um rebanho foram positivas por PCR. No entanto, todas as amostras de soro dos mesmos animais foram negativas por PCR e isolamento viral. Em um outro estudo similar, foi isolado o vírus de 4/11 amostras positivas por PCR, demonstrando que replicação viral pode ocorrer na ausência de viremia, uma vez que 11/11 das amostras de soro foram negativas por PCR e isolamento.

Na grande maioria dos casos, a infecção aguda em machos é clinicamente inaparente. Nesses animais, a viremia normalmente está presente em 100% dos animais nos primeiros 10 dias pi sendo, no entanto, detectável até 3-4 semanas pi. A presença de vírus no sêmen já foi detectada até 92 dpi.

Resultados de diferentes estudos ainda sugerem que a infecção persistente em suínos adul-

tos ocorre por um período mais curto quando comparado com a infecção em animais jovens.

5.2.2 Patogenia e sinais clínicos

Após a penetração, a replicação viral ocorre primariamente em macrófagos locais, de onde o vírus se dissemina e atinge órgãos linfóides, pulmões e, menos consistentemente, outros tecidos. A viremia é geralmente detectável 24 horas pi, e o vírus atinge títulos máximos no sangue, nos linfonodos e pulmões entre os dias 7 e 14 pi.

As manifestações da PRRS podem variar desde infecções subclínicas até a ocorrência de altas taxas de mortalidade nos rebanhos afetados. A ocorrência e severidade da doença clínica dependem de vários fatores, tais como a cepa viral e suscetibilidade do hospedeiro, além de infecções concomitantes e/ou secundárias. É frequente a ocorrência de infecções mistas com o circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), cujas lesões resultantes são muito semelhantes. A associação entre PRRSV e PCV-2 também pode resultar em pneumonia viral mais severa, decorrente da infecção pelo PRRSV, além de uma replicação mais eficiente e, conseqüentemente, lesões mais graves associadas ao PCV-2.

Sinais frequentemente observados incluem anorexia, letargia, hiperemia cutânea e cianose das extremidades. Infecções pós-natais, com cepas virulentas, geralmente resultam em aumento de volume dos linfonodos e em pneumonia intersticial, que podem ocorrer em suínos de todas as idades. O parênquima afetado apresenta-se ligeiramente firme e mosqueado, com coloração acinzentada e aspecto úmido. Lesões mais severas podem estar difusamente distribuídas. Microscopicamente, o septo alveolar encontra-se expandido por infiltração de macrófagos, linfócitos e plasmócitos e pode estar demarcado por pneumócitos tipo II hiperplásicos. Macrófagos necróticos, debris celulares e quantidade abundante de fluido seroso podem ser encontrados nos alvéolos pulmonares. A distribuição e severidade das lesões variam de acordo com a virulência da cepa. Deve-se levar em consideração que essas lesões não são patognomônicas, pois outras infecções virais e/ou bacterianas podem produzir lesões similares.

A infecção de fêmeas em idade reprodutiva ou em gestação pode resultar em abortamentos, retornos ao cio, natimortalidade e fetos parcialmente ou totalmente mumificados. Machos infectados apresentam perda de libido e redução na qualidade do sêmen devido a defeitos no acrossoma e um decréscimo na motilidade espermática. Embora os sinais clínicos variem amplamente em frequência e severidade, a infecção de neonatos frequentemente resulta em sinais respiratórios graves e elevadas taxas de mortalidade.

Na maioria das infecções causadas por PRRSV, os sinais clínicos associados a perdas reprodutivas não são específicos para uma determinada fase de gestação. Inicialmente, as perdas reprodutivas foram associadas com abortamentos em fases tardias. No entanto, em estudos subsequentes, foram observados abortamentos nas diferentes fases de gestação, tanto em surtos da doença como em condições experimentais.

5.2.3 Imunidade

Diversos estudos em animais têm demonstrado uma produção reduzida de interferon alfa e citocinas inflamatórias em resposta à infecção pelo PRRSV. Essa resposta inata de magnitude fraca poderia ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da ocorrência de infecções secundárias concomitantes.

A resposta imune humoral desempenha um importante papel na prevenção de reinfecções e na redução da excreção viral por animais infectados. A transferência passiva de anticorpos pelo colostro também confere completa proteção aos leitões nas primeiras semanas de vida. Níveis altos de proteção são geralmente observados contra reinfecções com cepas homólogas, porém proteção apenas parcial é obtida frente a cepas heterólogas. Imunoglobulinas específicas da classe IgM podem ser detectadas entre 5 e 7 dias após a infecção (dpi), e IgG entre os dias 7 e 10 pi. Anticorpos contra as proteínas estruturais e também contra algumas proteínas não-estruturais (principalmente Nsp2) já foram detectados no soro de animais convalescentes. Uma resposta humoral de grande magnitude contra a proteína do nucleo-

capsídeo (N) é geralmente observada e tem sido utilizada para o diagnóstico da infecção.

Anticorpos com atividade neutralizante, geralmente em baixos títulos, são detectáveis somente cerca de 3 a 4 semanas após a infecção. A detecção de viremia, mesmo na presença desses anticorpos, é um indicativo de que os níveis induzidos podem não ser suficientes para controlar a replicação viral. Além disso, concentrações baixas de anticorpos neutralizantes podem estar associadas com uma exacerbação da infecção, possivelmente através de um mecanismo conhecido como *antibody-dependent enhancement* (ADE). Diferentes proteínas do PRRSV podem induzir níveis variados de resposta imune celular, que pode ser detectada entre a segunda e oitava semanas após a infecção.

Os mecanismos responsáveis pela persistência do PRRSV ainda não estão completamente elucidados. No entanto, a incapacidade do sistema imunológico do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune efetiva contra o vírus parece ser um dos principais fatores responsáveis pela persistência viral em animais convalescentes. Além disso, um retardo significativo na produção de interferon gama, bem como na produção de anticorpos neutralizantes tem sido observados. Esses eventos podem ser um reflexo de mecanismos virais de evasão do sistema imunológico.

5.2.4 Diagnóstico

A suspeita de infecção pelo PRRSV deve ser considerada em rebanhos suínos que apresentem problemas reprodutivos e doença respiratória em animais de qualquer idade. Como outras infecções víricas e bacterianas podem causar manifestações clínico-patológicas semelhantes, o diagnóstico requer necessariamente a realização de testes laboratoriais.

Em casos de doença clínica ou perdas reprodutivas (abortos, natimortalidade etc.), o método diagnóstico mais indicado é o isolamento do vírus a partir de tecidos ou secreções de animais afetados. O isolamento pode ser realizado a partir do soro ou de tecidos (pulmões, tonsilas e linfonodos), pela inoculação do material suspeito em

macrófagos alveolares cultivados *in vitro* ou em células MARC-145. Não obstante, a inoculação de homogenados de tecidos suspeitos em suínos jovens (bioensaio) consiste no método mais sensível para a detecção do PRRSV nesses materiais. O PRRSV produz efeito citopático característico em células de cultivo, e a identidade do agente pode ser comprovada por imunofluorescência (IFA) ou por neutralização com soro imune específico.

A técnica de PCR em tempo real também tem sido usada rotineiramente para o diagnóstico direto da infecção, possibilitando a identificação de quantidades mínimas de RNA viral em amostras clínicas.

Em condições experimentais, a IFA em tecidos e/ou órgãos pode ser usada. No entanto, não é rotineiramente usada para o diagnóstico.

Testes sorológicos são rotineiramente utilizados para o monitoramento de rebanhos e podem também ser úteis para diagnosticar eventos de doença, pelo teste de soros pareados. Atualmente, um teste comercial de ELISA tem sido amplamente utilizado para o diagnóstico sorológico das infecções causadas pelo PRRSV. A técnica possui alta sensibilidade e especificidade, sendo possível a detecção de anticorpos específicos contra a proteína N já aos 7-10 dias pós-infecção (dpi). A detecção de anticorpos através da técnica de soroneutralização (SN) também tem sido utilizada. Entretanto, é importante ressaltar que anticorpos com atividade neutralizante somente são detectáveis apenas em fases tardias da infecção (30-60 dpi), fazendo com que o teste seja utilizado, sobretudo com outras finalidades. Os resultados de sorologia devem ser cuidadosamente analisados, uma vez que testes sorológicos convencionais não são capazes de diferenciar anticorpos vacinais daqueles produzidos em resposta a infecções naturais.

Informações acerca do histórico clínico-epidemiológico do rebanho, dados de produção, sinais clínicos, além de lesões macro e microscópicas, podem auxiliar no diagnóstico da enfermidade. O diagnóstico diferencial deve incluir outras enfermidades, como circovirose, parvovirose, doença de Aujeszky, influenza, peste suína clássica, encefalomielite hemaglutinante e leptospirose. Devido à possibilidade de infecções secundárias com outros vírus e bactérias, o diag-

nóstico definitivo requer a detecção do agente, de antígenos virais ou de anticorpos específicos para o PRRSV nos animais infectados.

5.2.5 Controle e profilaxia

Medidas básicas de profilaxia devem ser tomadas no sentido de prevenir a introdução do agente em propriedades ou áreas livres e também de evitar a reintrodução de novas cepas em rebanhos já infectados. É importante lembrar-se de que animais infectados e sêmen contaminado constituem-se nas principais fontes de infecção. Porém, outros fatores, como insetos, água, ração, proximidade das granjas, movimento e transporte de animais, são epidemiologicamente importantes e devem ser considerados em programas de controle. Assim, medidas gerais de biossegurança são essenciais para a profilaxia e controle da enfermidade.

Nos Estados Unidos, várias estratégias, como a depopulação parcial ou completa de granjas, identificação e remoção de animais infectados e manejo preventivo de rebanhos fechados, tem sido utilizadas visando ao controle e erradicação da infecção.

Vacinas atenuadas e inativadas estão comercialmente disponíveis nos Estados Unidos e na Europa. Em geral, essas vacinas induzem imunidade protetora satisfatória contra o vírus homólogo, mas produzem níveis variáveis de proteção contra vírus heterólogos. Além da eficácia discutível, as vacinas atenuadas apresentam um problema de segurança. A persistência do vírus vacinal em animais imunizados, em níveis semelhantes aos de amostras virulentas, e transmissão a animais soronegativos já foram demonstrados. Também se observou a transmissão do vírus vacinal pelo sêmen, bem como a ocorrência de infecções congênitas. Vacinas diferenciais, isto é, que permitam a distinção da resposta vacinal daquela induzida pela infecção natural também não se encontram disponíveis. Esses dados demonstram a evidente necessidade da elaboração de uma nova geração de vacinas para serem utilizadas no controle, profilaxia e eventual erradicação da enfermidade, principalmente em países onde a infecção é endêmica.

Apesar da ausência de atividade viral e sorologia positiva em suínos domésticos no Brasil, uma legislação estabelece critérios em relação à importação e exportação de animais, além de transporte, coleta de material para diagnóstico, quarentena e testes de diagnóstico, a fim de manter o rebanho suíno nacional livre da infecção pelo PRRSV.

6 Perspectivas

Apesar dos esforços direcionados ao controle e profilaxia das infecções causadas pelo PRRSV desde a sua identificação no início dos anos 1990, o vírus ainda continua a causar perdas econômicas significativas para suinocultura mundial. A dificuldade na obtenção de vacinas mais eficazes e seguras demonstra que muitos aspectos relacionados com a biologia dos arterivírus ainda não estão completamente elucidados. Nesse sentido, um grande avanço foi alcançado com a obtenção de clones infecciosos para o EAV e PRRSV, por meio da tecnologia de genética reversa. Com o uso dessa metodologia, tem sido possível a realização de modificações predefinidas no genoma viral (deleções, inserções e/ou substituições de nucleotídeos), possibilitando, assim, estudos dos mecanismos moleculares relacionados com replicação, patogenicidade, persistência e imunidade. Além disso, a tecnologia de genética reversa permite, ainda, a manipulação genômica, visando ao desenvolvimento de cepas vacinais atenuadas ou com alterações em proteínas virais para serem utilizadas na profilaxia e controle das infecções causadas pelos arterivírus.

7 Bibliografia consultada

- ALLENDE, R. et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. **Journal of Virology**, v.74, p.10834-10837, 2000.
- BALASURIYA, U.B.R.; MACLACHLAN, N.J. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.102, p.107-129, 2004.
- BLAHA, T. The "colorful" epidemiology of PRRSV. **Veterinary Research**, v.31, p.77-83, 2000.
- CASTILLO-OLIVARES, J. et al. Generation of a candidate live marker vaccine for equine arteritis virus by deletion of the major virus neutralization domain. **Journal of Virology**, v.77, p.8470-8480, 2003.
- CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, v.34, p.449-445, 2004.
- COLLINS, J.E. et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.117-126, 1992.
- DEA, S. et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. **Archives of Virology**, v.145, p.659-688, 2000.
- DEL PIERO, F. Equine viral arteritis. **Veterinary Pathology**, v.37, p.287-296, 2000.
- DELLPUTE, P.L.; NAUWYNCK, H.J. Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. **Journal of Virology**, v.78, p.8094-8101, 2004.
- DIEL, D. et al. Prevalência de anticorpos para os vírus da influenza, arterite viral e herpesvírus em equinos das regiões norte e noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p.1467-1473, 2006.
- GOYAL, S.M. Porcine reproductive and respiratory syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.656-664, 1993.
- HANADA, K. et al. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, p.1024-1031, 2005.
- LARA, M.C.C.S.H. et al. Prevalência de anticorpos antivírus da arterite dos equinos em cavalos criados no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.223-227, 2002.
- LOPEZ, O.J.; OSORIO, F.A. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.102, p.155-163, 2004.
- MEULENBERG, J.J. et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. **Virology**, v.192, p.62-72, 1993.
- MEULENBERG, J.J. PRRSV, the virus. **Veterinary Research**, v.31, p.11-21, 2000.
- MINKE, J.M.; AUDONNET, J.C.; FISCHER, L. Equine viral vaccines: the past, present and future. **Veterinary Research**, v.35, p.425-443, 2004.

- MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.
- MURTAUGH, M.; XIAO, Z.; ZUCKERMANN, F. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. **Viral Immunology**, v.15, p.533-547, 2002.
- NELSEN, C.J.; MURTAUGH, M.P.; FAABERG, K.S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. **Journal of Virology**, v.73, p.270-280, 1999.
- NEUMANN, E.J. et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, p.385-392, 2005.
- OLEKSIWICZ, M.B. et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. **Journal of Virology**, v.75, p.3277-3290, 2001.
- PLAGEMANN, P.G.W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.903-908, 2003.
- PRIETO, C.; CASTRO, J.M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. **Theriogenology**, v.63, p.1-16, 2005.
- ROOP, S. et al. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. **Journal of Virology**, v.78, p.3684-3703, 2004.
- SNIJDER, E.J.; MEULENBERG, J.M. Arteriviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.37, p.1205-1220.
- STADEJEK, T. et al. Genetic diversity of equine arteritis virus. **The Journal of General Virology**, v.80, p.691-699, 1999.
- TAKADA, A.; KAWAOKA, Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and *in vivo* implications. **Reviews in Medical Virology**, v.13, p.387-398, 2003.
- WANG, X.C.; SMITH, S.L.; GODENY, E.K. Organization of the simian hemorrhagic fever virus genome and identification of the sgRNA junction sequences. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.440, p.281-287, 1998.
- WENSVOORT, G. et al. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.134-138, 1992.
- WU, W.H. et al. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. **Virology**, v.287, p.183-191, 2001.
- YOO, D. et al. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.102, p.143-54, 2004.
- ZIMMERMAN, J. et al. PRRS virus (Porcine Arterivirus). In: STRAW, B.E. et al. (eds). **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999. p.387-417.
- ZIMMERMAN, J.; YOON, K. (eds). **PRRSV Compendium: A comprehensive reference on PRRS for pork producers, veterinary practitioners, and researchers**. 2.ed. Des Moines, IA: National Pork Board, 2003. 294p.

1 Introdução	659
2 Classificação	659
2.1 <i>Paramyxovirinae</i>	659
2.2 <i>Pneumovirinae</i>	659
3 Replicação	659
4 Propriedades físico-químicas	659
5 Estrutura dos vírions	661
6 O genoma	664
7 O ciclo replicativo	664
8 Paramixovírus de interesse veterinário	666
8.1 Vírus respiratório sincicial bovino	667
8.1.1 Epidemiologia	667
8.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	668
8.1.3 Imunidade	669
8.1.4 Diagnóstico	670
8.1.5 Controle e profilaxia	670
8.2 Vírus da parainfluenza bovina tipo 3	670
8.2.1 Epidemiologia	671
8.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	671
8.2.3 Imunidade	672
8.2.4 Diagnóstico	672
8.2.5 Controle e profilaxia	672
8.3 Vírus da peste bovina	672
8.4 Vírus da peste dos pequenos ruminantes	673

¹ Renata Dezengrini foi a responsável pelas seções “Peste Bovina” e “Vírus da Peste dos Pequenos Ruminantes”.

8.5 Vírus da cinomose	674
8.5.1 Epidemiologia	674
8.5.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	675
8.5.3 Imunidade	676
8.5.4 Diagnóstico	676
8.5.5 Controle e profilaxia	677
8.6 Vírus da parainfluenza canina tipo 2	678
8.6.1 Epidemiologia	678
8.6.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	678
8.6.3 Imunidade	679
8.6.4 Diagnóstico	679
8.6.5 Prevenção e controle	679
8.7 Metapneumovírus aviários	679
8.7.1 Epidemiologia	680
8.7.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	680
8.7.3 Imunidade	681
8.7.4 Diagnóstico	682
8.7.5 Controle e profilaxia	682
8.8 Vírus da doença de Newcastle	683
8.8.1 O agente	683
8.8.2 Histórico e epidemiologia	683
8.8.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia	684
8.8.4 Diagnóstico	685
8.8.5 Controle e profilaxia	686
9 Bibliografia consultada	686

1 Introdução

Os vírus da família *Paramyxoviridae* incluem importantes patógenos do trato respiratório de animais e humanos. A família é formada por vírus envelopados, em sua maioria esféricos, com projeções glicoprotéicas de superfície. Os vírions possuem um nucleocapsídeo helicoidal que envolve o genoma de RNA fita simples e polaridade negativa. Os paramixovírus são responsáveis por algumas doenças de grande relevância em Medicina Veterinária, tanto por sua prevalência como pelo impacto econômico na produção animal. Dentre os paramixovírus de importância veterinária, destacam-se aqueles amplamente conhecidos, como o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bPIV-3), o vírus da cinomose canina (CDV), o vírus da peste bovina (*Rinderpest virus*, RPV) e o vírus da doença de Newcastle (NDV). A família agrega ainda outros vírus recentemente identificados, muito importantes devido ao seu potencial zoonótico, como os vírus Hendra e Nipah. Esta família também abrange alguns vírus de grande importância para a saúde humana, como o vírus respiratório sincicial humano (HRSV) e o vírus do sarampo (MV), dentre outros.

2 Classificação

A família *Paramyxoviridae* é classificada na ordem *Mononegavirales*, que inclui ainda as famílias *Rhabdoviridae* e *Filoviridae*. Na família *Paramyxoviridae*, estão incluídas duas subfamílias: *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*. A classificação taxonômica atual dessa família está apresentada na Tabela 26.1.

2.1 *Paramyxovirinae*

Esta subfamília possui seis gêneros, listados abaixo, juntamente com o vírus protótipo de cada gênero:

- *Respirovirus*: vírus Sendai;
- *Morbillivirus*: vírus do sarampo;
- *Rubulavirus*: vírus da caxumba;
- *Henipavirus*: vírus Hendra;

- *Avulavirus*: vírus da doença de Newcastle;
- *Virus TPMV-like*: vírus Tupaia.

2.2 *Pneumovirinae*

Esta subfamília possui dois gêneros:

- *Pneumovirus*: vírus respiratório sincicial humano;
- *Metapneumovirus*: vírus da rinotraqueíte dos perus.

3 Replicação

Os paramixovírus podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, tanto naturalmente quanto sob condições experimentais, e a infecção é assintomática em muitas espécies. No entanto, as infecções de relevância clínica são restritas a algumas delas.

A replicação desses vírus *in vitro* ocorre em vários tipos de células primárias e de linhagem, principalmente de origem pulmonar e renal, homólogas à espécie de origem do vírus. É necessária a adaptação dos paramixovírus ao cultivo por várias passagens. A infecção por esses vírus é citolítica, e uma característica é a fusão entre células, formando células gigantes multinucleadas (sincícios). A replicação ocorre no citoplasma das células hospedeiras, porém os morbilivírus podem produzir inclusões intranucleares acidofílicas. Os vírus da parainfluenza e alguns morbilivírus possuem, ainda, a propriedade de hemadsorção.

4 Propriedades físico-químicas

Os paramixovírus são sensíveis a pH ácido e ao aquecimento a 56°C por 30 minutos. A exposição a solventes lipídicos, detergentes não-iônicos, formaldeído e agentes oxidantes destrói a infectividade viral. Os vírions são extremamente lábeis, mas permanecem viáveis a temperaturas de -50°C ou menos por muitos meses, porém episódios de congelamento e descongelamento podem inativar a infectividade. Os vírions apresentam uma densidade de 1,18 a 1,23 g/mL, determinada por centrifugação em gradiente de sacarose.

Tabela 26.1. Classificação dos membros da família *Paramyxoviridae* e seus respectivos hospedeiros. Os hospedeiros naturais estão em negrito, e os secundários estão entre parênteses.

Subfamília	Gênero	Espécie	Hospedeiros
Paramyxovirinae	Respirovirus	Vírus da parainfluenza bovina 3 (bPIV-3)	bovinos (e ovinos)
		Vírus Sendai (SeV) ou vírus da parainfluenza murina 1	camundongos (suínos, ratos, hamsters e cobaias)
		Vírus símio tipo 10 (SV-10)	primatas
		Paramixovírus do salmão do Atlântico	Salmões
		Vírus da parainfluenza humana 1 e 3 (hPIV-1 e 3)	humanos (outros primatas, hamsters, cobaias, furões, ratos cauda de algodão)
	Morbillivirus	Vírus da cinomose (CDV)	caninos (leões, furões, guaxinins, pandas, entre outros)
		Vírus da peste bovina (RPV)	bovinos (ovinos, caprinos e suínos)
		Vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV)	ovinos, caprinos (alguns ruminantes selvagens)
		Vírus da peste das focas (PDV)	espécies de foca
		Morbilivírus dos cetáceos (CeMV)	espécies de baleias, golfinhos e focas
		Vírus do sarampo (MV)	humanos
	Rubulavirus	Vírus da parainfluenza suína	suínos
		Rubulavírus suíno (PoRV) ou vírus La-Piedad-Michoacan-Mexico	suínos
		Vírus da parainfluenza simia 5 e 41 (SV-5 e 41)	primatas (caninos, felinos, suínos, hamsters, cobaias)
		Vírus da caxumba (MuV)	humanos
		Vírus da parainfluenza humana 2, 4a e 4b (HPIV-2, 4a e 4b)	humanos
		Vírus Mapuera (MPRV)	morcegos (<i>Sturnira kikum</i>)
		Yucaipa vírus	galinhas

Tabela 26.1. Continuação

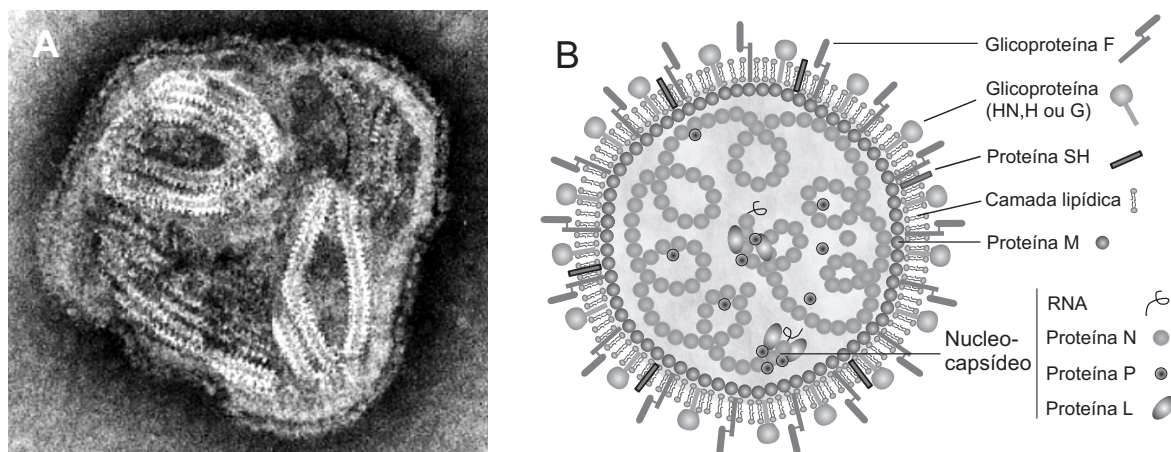
Subfamília	Gênero	Espécie	Hospedeiro
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Henipavirus</i>	Vírus Hendra (HeV)	morcegos (eqüinos, humanos)
		Vírus Nipah	morcegos (suínos, humanos, caninos e felinos)
	<i>Avulavirus</i>	Vírus da doença de Newcastle (NDV) ou paramixovírus 1 aviário (APMV-1)	galinhas , patos, gansos, perus, aves silvestres e aquáticas, humanos
		Paramixovírus aviários 2 a 9 (APMV-2 a 9)	galinhas, perus, aves silvestres
	<i>Vírus TPMV-like</i>	Vírus Tupaia (TPMV)	<i>Tupaia belangeri</i>
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV)	bovinos (ovinos)
		Vírus respiratório sincicial ovino (ORSV)	ovinos (bovinos)
		Vírus da pneumonia murina (MPV)	camundongos
		Vírus respiratório sincicial humano (hRSV)	humanos
	<i>Metapneumovirus</i>	Vírus da rinotraqueíte dos perus (TRTV) ou pneumovírus aviário (PVA)	galinhas e perus
		Metapneumovírus humano (hMPV)	humanos

5 Estrutura dos vírions

Os paramixovírus possuem uma arquitetura complexa, que consiste basicamente de um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo e uma proteína matriz. As partículas víricas são envelopadas, aproximadamente esféricas ou pleomórficas, com 150 a 300 nm de diâmetro. Partículas filamentosas são relativamente frequentes e podem ter entre 1.000 e 10.000 nm de extensão. Nos vírions intactos, a única estrutura visível por microscopia eletrônica (ME) é o envelope, com 7 a 15 nm de espessura, recoberto por projeções de 8 a 20 nm de extensão, constituídas pelas glicoproteínas de superfície. Os paramixovírus contêm duas glicoproteínas de envelope; alguns rubulavírus, e todos os pneumovírus contêm uma terceira proteína integral de membrana. Uma delas (HN, H ou G, dependendo do gênero) está envolvida na ligação aos receptores, e a glicoproteína F é responsável pela fusão do envelope viral com a

membrana plasmática celular durante o processo de penetração. A Figura 26.1 apresenta uma fotografia de ME e uma representação esquemática de um vírion dessa família.

O nucleocapsídeo possui simetria helicoidal, apresenta entre 13 e 18 nm de diâmetro por 600 a 1.000 nm de extensão. O nucleocapsídeo é formado por um complexo formado pelo genoma RNA, conjugado com aproximadamente 2.500 cópias da proteína N (ou NP), ao qual estão associadas 300 cópias da proteína P e 50 moléculas da proteína L. O complexo ribonucleoproteína (RNA +N) se constitui no substrato para a síntese de RNA durante a transcrição e replicação do genoma, ou seja, esses mecanismos ocorrem no genoma recoberto pelas proteínas N. Além das glicoproteínas do envelope e das proteínas do nucleocapsídeo, os vírions contêm múltiplas cópias da proteína matriz (M) que preenchem o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope (Figura 26.1). As proteínas codificadas pelos paramixovírus e as suas



Fonte: A) Dra. Linda Stannard, www.uct.ac.za.

Figura 26.1. Vírions da família *Paramyxoviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica de um paramixovírus humano. Nota-se o nucleocapsídeo helicoidal enovelado no interior da partícula; B) Ilustração esquemática de uma partícula vírica e seus componentes.

principais atividades biológicas estão apresentadas a seguir.

A glicoproteína H, HN ou G (dependendo do vírus) é responsável pela adsorção dos vírions à superfície das células hospedeiras. Essas glicoproteínas estão localizadas no envelope viral e projetam-se externamente como espículas a partir da superfície dos vírions. Cada espécie de vírus contém uma delas (H, HN ou G). A glicoproteína H (respirovírus e morbilivírus) possui a atividade de hemaglutinação. Essa atividade é utilizada na identificação de isolados e também em diagnóstico. A glicoproteína HN (rubulovírus) apresenta atividade hemaglutinante e de neuraminidase. Esta última refere-se à capacidade de clivar o receptor celular (ácido siálico), prevenindo que partículas virais se liguem em células já infectadas ou fiquem retidas na membrana celular durante o egresso de vírions recém-formados. Para muitos paramixovírus, a co-expressão de HN (H para morbilivírus), juntamente com a proteína F, é necessária para a formação de sincícios, sugerindo que as glicoproteínas HN ou H possuem participação na atividade fusogênica. Para os paramixovírus que não possuem as glicoproteínas HN ou H, a ligação aos receptores pode ser realizada pela glicoproteína G, porém acredita-se que esta proteína não seja essencial para essa função. Nesses vírus, a proteína F pode participar da ligação dos vírions aos receptores.

A glicoproteína de fusão (F) é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular, permitindo a penetração do nucleocapsídeo na célula hospedeira, que é sintetizada como um precursor (F0), que se torna ativo pela clivagem em F1 e F2. Esta clivagem é essencial para a infectividade dos paramixovírus e exerce um papel determinante na patogenicidade viral. A clivagem ocorre nos estágios finais do ciclo replicativo, no interior de vesículas do complexo de Golgi, durante o transporte das proteínas virais para a membrana plasmática. Cepas que clivam a F0 com mais eficiência tendem a ser mais virulentas, em contraste com cepas deficientes na clivagem. Uma das características dos membros da família *Paramyxoviridae* é o não requerimento de pH baixo para a atividade fusogênica, ou seja, a fusão do envelope com a membrana plasmática e a conseqüente penetração do nucleocapsídeo ocorre na superfície celular, em pH neutro. Por isso são chamados vírus pH independentes.

A proteína M é a mais abundante dos vírions, preenchendo o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope. A sua função ainda não foi completamente elucidada, mas sabe-se que essa proteína exerce um importante papel na interação entre o nucleocapsídeo viral e a membrana da célula hospedeira durante o processo de morfogênese, maturação e brotamento dos vírions. Portanto, a proteína M é considerada essencial na

morfogênese viral, interagindo simultaneamente com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas inseridas na membrana (F, HN ou G) e com o nucleocapsídeo. Essas interações induzem o brotamento das novas partículas na superfície da célula hospedeira.

A proteína N (ou NP) é abundante nos vírions e se associa intimamente ao genoma viral, formando o nucleocapsídeo, sendo responsável pela proteção do genoma contra a digestão por nucleases. Essa proteína permanece associada com o genoma mesmo durante a transcrição e replicação. Além da N, as proteínas P-L também estão associadas com o genoma durante esses processos. A proteína N também participa da morfogênese das novas partículas virais, pela interação com a proteína M. A concentração intracelular de proteína N parece ser o principal fator que controla a transição entre transcrição (no início da infecção) e replicação do genoma (em etapas tardias do ciclo replicativo). Aproximadamente 80% da sequência da proteína N são muito conservadas entre os paramixovírus.

A proteína L é a menos abundante dos vírions (~50 cópias por vírion) e representa a subunidade catalítica da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A sequência de nucleotídeos do gene da proteína L é muito conservada entre os membros de uma mesma subfamília, o que não se observa entre vírus de subfamílias diferentes. Existem cinco sequências curtas localizadas próximo ao centro do gene que apresentam uma alta homologia, também com RNA polimerases de outras famílias virais. Essas sequências parecem codificar domínios protéicos que são essenciais para a atividade da RdRp. A proteína L exerce a sua atividade somente quando é formado um complexo com a proteína P e ambas são necessárias para a atividade de polimerização do RNA a partir de moldes de RNA conjugados com a proteína N.

A proteína P é um componente essencial do complexo replicase. Embora toda a atividade catalítica da transcriptase viral seja atribuída à proteína L, esta somente se liga ao complexo RNA:N (denominado ribonucleoproteína; RNP) na presença da proteína P. O sítio de ligação da proteína P ao complexo RNA:N, chamado de

P-carboxi (localizado na porção C-terminal da proteína), é relativamente conservado entre os membros da subfamília *Paramyxovirinae*. Um mecanismo, conhecido como edição de RNA (*RNA editing*), permite que várias proteínas diferentes sejam produzidas a partir do gene P. Uma proteína não-estrutural menor, chamada V, é produzida pelo mesmo RNA mensageiro (mRNA) por todos os membros da subfamília *Paramyxovirinae*. Os gêneros *Respirovirus* e *Morbillivirus* produzem uma proteína não-estrutural adicional, denominada C, a partir de uma segunda fase aberta de leitura (ORF) do mRNA do gene P. Proteínas adicionais, denominadas W (respirovírus, henipavírus e morbilivírus), D (respirovírus), I (rubulavírus) entre outras, podem ser formadas pela edição do mRNA do gene P, pela adição de 1 ou 2 nucleotídeos (nt), alterando a fase de leitura do mRNA e resultando em uma sequência diferente de aminoácidos. Essas proteínas, embora não essenciais à replicação viral, auxiliam na sobrevivência do vírus *in vitro* e são importantes determinantes da virulência. A proteína P, juntamente com a proteína N, parece estar envolvida na mudança do processo de transcrição (síntese de mRNA) para o de replicação (síntese de RNA genômico a partir de RNA antígeno). Uma regulação da síntese do RNA genômico viral também é exercida pela proteína C. As proteínas V, W e C também possuem participação na evasão da resposta imune inata pelo vírus. Juntamente com a proteína N, a proteína P forma agregados citoplasmáticos conhecidos como corpúsculos de inclusão nas células infectadas.

O gene M2 contém duas ORFs, que codificam dois polipeptídeos, denominados M2-1 e M2-2. Ambos estão associados ao complexo do nucleocapsídeo dos pneumovírus e metapneumovírus e parecem não possuir homólogos em outros vírus RNA de polaridade negativa não-segmentados. A proteína M2-1 está envolvida na elongação da transcrição e participa da indução da resposta inflamatória do hospedeiro e exacerbação dos sinais clínicos da infecção viral. A proteína M2-2 não é essencial para a multiplicação do vírus em cultivo celular, porém, a sua deleção provoca uma redução na eficiência de replicação. É provável que também possua participação na

mudança de replicação para morfogênese viral, que precedem o egresso dos vírions.

A proteína SH (ou A) é uma proteína integral de membrana com a porção C-terminal, localizada na região extracelular. Apesar de ser expressa na superfície da célula hospedeira, baixos níveis da proteína SH são detectados nos vírions. A SH pode apresentar-se sob diversas formas, dependendo de seu estado de glicosilação. Embora a sua função ainda não tenha sido totalmente esclarecida e não seja uma proteína absolutamente essencial às funções de adsorção, infectividade e montagem das partículas virais, parece aumentar a eficiência de fusão promovida pela proteína F, contribuindo para a formação de sincícios. Essa proteína não é essencial para a multiplicação viral em cultivo celular, porém a deleção de seu gene resulta em redução substancial nessas atividades. Existem indícios também de sua participação na evasão à resposta imune do hospedeiro.

Os vírus respiratórios sinciciais são os únicos paramixovírus que possuem dois genes que codificam as proteínas não-estruturais (NS), precedendo o gene da nucleoproteína. A proteína NS1 atua como um potente inibidor da transcrição e replicação do RNA viral. Esta proteína também pode interagir com as proteínas M e P, porém ainda não foi definido o significado biológico dessa interação. A NS2 é uma proteína não-essencial para a replicação do vírus *in vitro*. Ambas participam da evasão viral a respostas celulares antivirais induzidas pela produção de interferons α e β .

6 O genoma

O genoma dos paramixovírus é constituído por uma molécula de RNA linear de fita simples, polaridade negativa, com 15 a 19 quilobases (kb). Por possuir polaridade negativa, o genoma desnudo não é infeccioso quando introduzido em células permissivas. Os vírions podem conter, ocasionalmente, uma cópia simples de RNA de polaridade positiva (RNA antígeno). O genoma contém seqüências não-codificantes na extremidade 3' (chamada *leader*), com aproximadamente 50 nt, e, na extremidade 5', com 50 a 160 nt (Figura 26.2). Essas regiões são importantes para a transcrição e replicação do genoma.

A organização genômica e o número de genes dos paramixovírus variam de acordo com a subfamília, com pequenas variações também dentro dos gêneros. Em geral, os genomas possuem entre seis e dez genes (Figura 26.2). Os vírus da subfamília *Paramyxovirinae* possuem seis (NP, P/C/V, M, F, H e L) ou sete genes (o vírus da caxumba possui um gene adicional, o SH). Os vírus da subfamília *Pneumovirinae* possuem dez (vírus respiratório sincicial, vírus da pneumonia murina) ou oito genes (pneumovírus aviário). A maioria dos mRNA contém apenas uma ORF e é traduzida em uma proteína, porém, em alguns vírus, os mRNA possuem mais de uma ORF, resultando na produção de mais de um produto. Os mRNA dos diferentes genes são transcritos individualmente a partir do RNA genômico. Cada gene contém sinais para o início e término da transcrição, presentes nas regiões intergênicas, que possuem entre 1 e 56 nt.

7 O ciclo replicativo

Os paramixovírus são agrupados na classe V, conforme a classificação de Baltimore (1971) com relação às estratégias de replicação. De forma similar aos outros vírus dessa classe, todos os processos relacionados com a replicação viral ocorrem no citoplasma da célula hospedeira. Em cultivos celulares, o ciclo replicativo geralmente se completa em 14 a 30 horas, mas pode ter duração inferior. Cepas virulentas do NDV podem completar o ciclo replicativo em aproximadamente 10 horas.

Os vírions ligam-se a receptores celulares específicos (CD46 e CD150 para o vírus do sarampo, provavelmente glicosaminoglicanos ou moléculas semelhantes a heparina para os pneumovírus, ácido siálico para os demais) e penetram na célula por fusão do envelope viral com a membrana plasmática na superfície celular, em condições de pH neutro. Para que a proteína precursora F0 exerça sua função fusogênica, é necessária a sua prévia clivagem em F1 e F2 por proteases celulares. Células infectadas podem se fundir, formando sincícios ou células gigantes multinucleadas características, que podem produzir necrose tecidual *in vivo*. Uma vez no citoplasma, o nucleocapsídeo (RNA:N) é transcrito

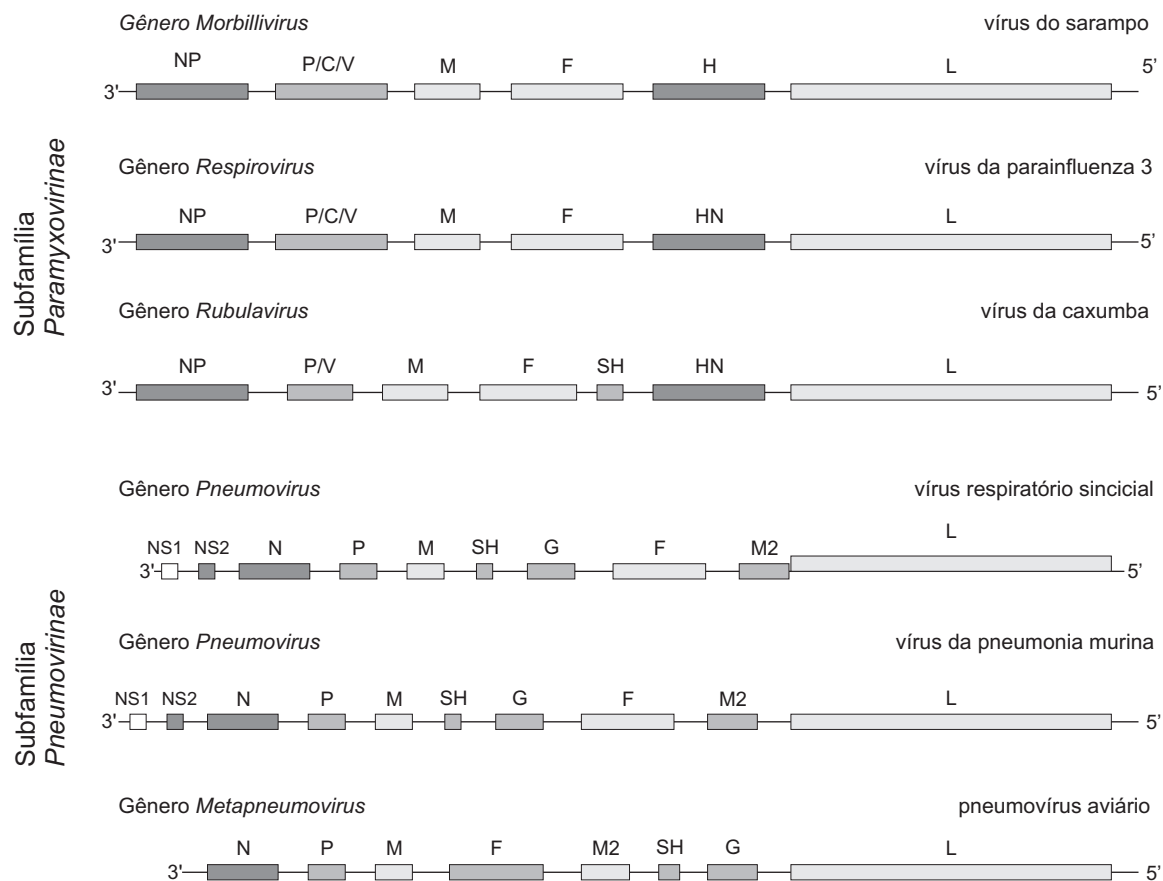


Figura 26.2. Estrutura e organização genômica dos vírus da família *Paramyxoviridae*. As linhas finas representam o RNA genômico; os retângulos representam os genes individuais. M) proteína da matriz; H) hemaglutinina; F) proteína de fusão; L) polimerase; NP) nucleoproteína; HN) hemaglutinina-neuraminidase; P) fosfoproteína; C/V) produtos do gene P; SH) proteína pequena hidrofóbica; G) glicoproteína do envelope; NS1 e NS2) proteínas não-estruturais; M2) proteína associada ao envelope.

progressivamente a partir da extremidade 3' pelo complexo polimerase viral (proteínas L e P).

A transcrição dos genes dos vírus RNA de polaridade negativa não-segmentados ocorre de forma individual, ou seja, cada gene possui sinais para a iniciação e término da transcrição. Com isso, cada gene é transcrito e resulta em um mRNA individual. Os mRNAs contêm 5' cap na extremidade e são poliadenilados, sendo traduzidos em proteínas pelos ribossomos celulares. As etapas de transcrição e tradução prosseguem até que ocorra o acúmulo das proteínas virais no citoplasma das células infectadas. Em um determinado momento, por mecanismos ainda não identificados, o complexo polimerase cessa a produção de mRNAs individuais e passa a transcrever o genoma em toda a sua extensão, produzindo

cópias de RNA de sentido antígenômico (polaridade positiva). As proteínas N e P parecem desempenhar um papel importante nessa transição entre transcrição e replicação, fazendo com que o complexo replicase não reconheça os sinais de terminação existentes nas regiões intergênicas e realize a transcrição integral do genoma e síntese da cópia antígenômica (RNA +). Esta cópia antígenômica serve de molde para a produção de moléculas de RNA de sentido genômico (RNA -). À medida que são sintetizadas, as moléculas de RNA de sentido negativo se associam com moléculas da proteína N, formando nucleocapsídeos helicoidais flexíveis que, posteriormente, se associam com as proteínas P e L. A montagem dos nucleocapsídeos ocorre concomitantemente com a síntese do RNA antígenômico e genômico, e os

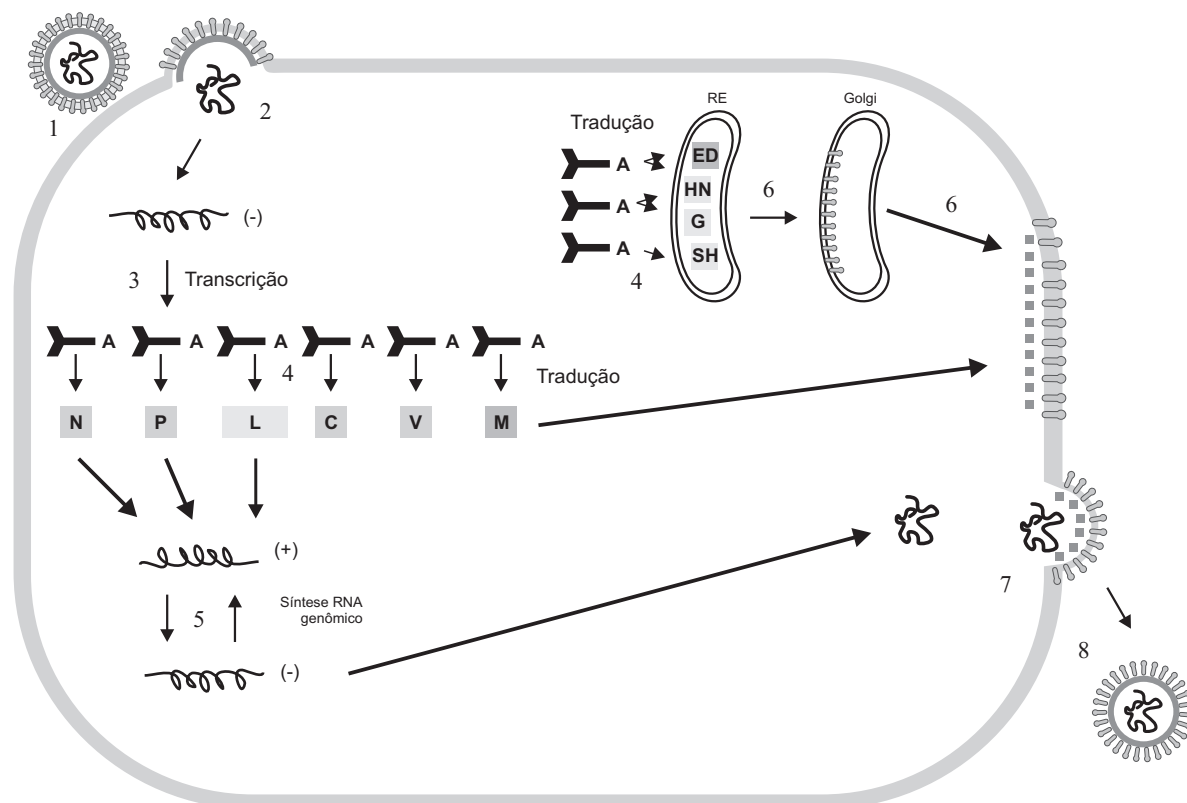


Figura 26.3. Ilustração esquemática do ciclo replicativo da família *Paramyxoviridae*. 1) Ligação aos receptores; 2) Penetração por fusão do envelope viral com a membrana plasmática; 3) Transcrição dos mRNA pelo complexo polimerase; 4) Tradução das proteínas virais pelos ribossomos celulares; 5) Síntese de RNA antígeno e replicação do RNA genômico pelo complexo polimerase; 6) Processamento e transporte das proteínas do envelope e inserção na membrana plasmática; 7) Morfogênese; 8) Egresso.

RNAs virais somente são encontrados como nucleocapsídeos no interior da célula.

A primeira etapa da morfogênese envolve a associação entre as proteínas N e o genoma, seguido da adição do complexo L-P. A segunda etapa da montagem ocorre na membrana plasmática. As glicoproteínas HN (ou as equivalentes nos outros vírus) e F (também a SH) produzidas no retículo endoplasmático (RE) e modificadas no complexo de Golgi são transportadas em vesículas trans-Golgi até a membrana plasmática, onde são inseridas. Durante este transporte, a proteína precursora F0 é clivada em F1 e F2, evento essencial para a infectividade da progênie viral. As etapas seguintes da morfogênese são pouco conhecidas. Acredita-se que múltiplas cópias da proteína M sejam transportadas até a membrana

plasmática, onde se associariam com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas ali inseridas. Os nucleocapsídeos, então, interagiriam – através da proteína N – com as moléculas da proteína M, resultando na sua protusão e brotamento na membrana plasmática e no egresso dos vírions. A Figura 26.3 representa um esquema do ciclo replicativo dos paramixovírus.

8 Paramixovírus de interesse veterinário

As duas subfamílias dos paramixovírus abrigam vírus associados com doenças importantes em animais. Esses vírus e as doenças que eles causam serão abordados a seguir.

8.1 Vírus respiratório sincicial bovino

Os vírus respiratórios sinciciais (RSV) foram descritos, pela primeira vez, em 1955, durante um episódio de doença respiratória em chimpanzés de um laboratório em Washington (USA). O agente viral isolado nessa ocasião e, inicialmente, denominado *chimpanzee coryza agent*, foi, posteriormente, renomeado como *respiratory syncytial virus* (RSV), baseado no seu efeito citopático característico em cultivo celular. Diversos estudos subsequentes levaram ao estabelecimento da importância do RSV como agente de doença respiratória em crianças no mundo inteiro, e o agente passou a ser conhecido com vírus respiratório sincicial humano (*human respiratory syncytial virus*, HRSV). Mais de uma década após, um vírus estreitamente relacionado ao HRSV foi isolado de bovinos em um episódio de doença respiratória severa na Suíça e no Japão, sendo denominado vírus respiratório sincicial bovino (*bovine respiratory syncytial virus*, BRSV).

Atualmente, o BRSV possui distribuição mundial e está associado com doença respiratória severa em bovinos jovens, caracterizada por bronquiolite e pneumonia intersticial. É um dos agentes envolvidos no complexo respiratório bovino, responsável por grandes perdas econômicas, principalmente em bezerros com idade inferior a um ano. Outros agentes virais, como o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), vírus da parainfluenza bovina (bPI-3) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV), e bacterianos (*Pasteurella* sp.) também são frequentemente associados com este complexo respiratório.

O BRSV pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus*, e possui relação antigênica com o HRSV e com os vírus respiratórios sinciciais ovino e caprino (ORSV e CRSV). O BRSV possui várias similaridades com o HRSV, especialmente no que se refere à estrutura e morfologia dos vírions, organização genômica e propriedades antigênicas.

Os membros da subfamília *Pneumovirinae* diferem dos demais paramixovírus pela ausência das proteínas neuraminidase e hemaglutinina no envelope viral; em certas dimensões das projeções de superfície e no diâmetro do nucleocapsídeo. Os vírions do BRSV são pleomórficos, enve-

lopados e com dimensões variáveis. As partículas esféricas medem entre 80 e 350 nm de diâmetro, e as partículas filamentosas medem entre 60 e 100 nm. Os vírions são muito sensíveis a pH ácido e são facilmente inativados pelo aquecimento a 56°C por 30 minutos. A exposição a dietiléter, clorofórmio e outros solventes apolares também destrói a infectividade viral. O vírus é extremamente lábil sob condições ambientais com temperatura elevada, mas permanece estável sob temperaturas de -50°C ou menos por muitos meses. Episódios de congelamento e descongelamento também são deletérios para a infectividade viral.

O genoma do BRSV possui aproximadamente 15.000 nt, que codificam 10 polipeptídeos. As duas principais glicoproteínas do envelope são: a proteína G (responsável pela ligação aos receptores celulares) e a proteína F (responsável pela fusão e penetração do vírus na célula e pela formação de sincícios). Outra proteína de superfície é a proteína hidrofóbica pequena (*small hydrophobic protein*, SH). A estrutura e função das proteínas M, N, fosfoproteína P, proteínas M2 e L parecem ser semelhantes às descritas para o restante da família.

As diferenças antigênicas entre os isolados de BRSV, detectadas pelo uso de anticorpos monoclonais, levaram à classificação antigênica dessas amostras em subgrupos, denominados A, AB (ou intermediário) e B. No entanto, alguns isolados não se enquadram em nenhum desses grupos. As implicações práticas dessa diversidade quanto à patogenicidade e imunoprofilaxia ainda não foram devidamente estudadas.

8.1.1 Epidemiologia

O BRSV possui distribuição mundial, mas uma estimativa precisa da ocorrência da infecção é difícil, uma vez que outros patógenos virais e bacterianos podem estar envolvidos nos casos de doença respiratória. A dificuldade de isolamento do agente também dificulta o diagnóstico, bem como a ocorrência de infecções subclínicas. Em regiões endêmicas, surtos de doença respiratória ocorrem, muitas vezes, esporadicamente, envolvendo apenas grupos de animais mais suscetíveis. Em surtos naturais, a doença clínica é raramente observada em animais com idade inferior

a duas semanas, sendo mais severa em bezerros entre um e cinco meses de idade. A doença é incomum entre animais com idade superior a nove meses, mas pode, ocasionalmente, ocorrer em animais adultos.

No Brasil, o vírus foi detectado pela primeira vez por Gonçalves et al. (1993), em amostras de pulmões de bezerros do estado do Rio Grande do Sul (RS). O isolamento e a identificação viral foram realizados por Arns et al. (2003), a partir de amostras de secreções naso-traqueais de animais com sinais respiratórios procedentes do RS. Em um estudo mais abrangente, foram isoladas e caracterizadas cinco amostras do BRSV oriundas de rebanhos leiteiros e de corte dos estados do RS e Minas Gerais. Todas as amostras analisadas pertencem ao subgrupo B.

Embora a forma de transmissão do BRSV durante a infecção natural não seja completamente definida, sugere-se que seja necessário o contato próximo entre animais. Dados experimentais demonstraram que a transmissão por aerossóis pode ocorrer a curtas distâncias. Animais expostos experimentalmente a aerossóis contendo o vírus e após inoculação intratraqueal apresentam lesões muito semelhantes às observadas a campo, o que sugere que a inoculação por aerossol simule a forma natural da infecção.

Em climas temperados, a maioria dos surtos associados ao BRSV ocorre no início do inverno, embora episódios severos da doença já tenham sido relatados no verão. Não se sabe como o BRSV se mantém entre os surtos, e é possível que o vírus permaneça circulante em baixos níveis entre os animais soropositivos. O reaparecimento do vírus em rebanhos fechados pode também ser explicado pela persistência do agente em animais infectados, uma vez que a aplicação de corticosteróides em animais soropositivos resulta em um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos. Alterações climáticas podem aumentar a incidência da infecção, principalmente o clima úmido e a presença de vento, assim como fatores que afetam a atividade mucociliar, como níveis elevados de amônia no ambiente. Embora boas condições e manejo adequado dos animais reduzam a incidência de infecções pelo BRSV, rebanhos em excelentes condições nesses aspectos também podem apresentar surtos severos. Isto

sugere que o BRSV pode causar doença sem a ocorrência de fatores ambientais predisponentes.

A morbidade da infecção pode atingir 80 a 100% dos animais. No entanto, a taxa de mortalidade raramente excede 5 a 10%, dependendo das condições sanitárias do rebanho.

8.1.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Embora a patogenia das infecções pelo BRSV não tenha sido totalmente esclarecida, diversas evidências indicam a importante participação de mecanismos imunomediados. A infecção pelo BRSV aumenta a aderência e colonização bacteriana e altera os mecanismos específicos e inespecíficos de defesa do trato respiratório. Por essas razões, estima-se que muitas pneumonias bacterianas se desenvolvam após infecções virais.

Após a penetração pela via respiratória, o BRSV replica nas células epiteliais da mucosa nasal, faringe, traquéia e pulmões. O vírus aparentemente não produz viremia e raramente foi detectado fora do sistema respiratório. Antígenos virais podem ser detectados na mucosa da nasofaringe dois dias após infecção experimental, bem como nos linfonodos traqueobronquiais. As células pulmonares somente aparecem infectadas entre 4 e 13 dias após a infecção. As células epiteliais dos bronquíolos são as primeiras a serem infectadas, seguidas pelas células alveolares. Antígenos virais podem também ser detectados em macrófagos alveolares, embora o papel dessas células na patogenia seja controverso. É provável que pelo menos um subgrupo de macrófagos alveolares possam ser permissivos à replicação viral e, portanto, possam contribuir para a patogênese da infecção. Além disso, os macrófagos ativados liberam citocinas que potencialmente contribuem para as lesões. O pico de excreção viral em secreções nasais ou pulmonares e em células pulmonares ocorre entre quatro e oito dias após a infecção. Em bovinos infectados experimentalmente, o vírus foi isolado de secreções nasais 24 horas pós-infecção, e o RNA viral foi detectado em secreções nasais pela reação em cadeia da polimerase acoplado à transcrição reversa (RT-PCR) até 17 dias pós-infecção. O vírus pode ser detectado em células oriundas de lavado pulmonar aos dois

dias após a infecção. Nos tecidos traqueais, o vírus foi detectado precocemente às 24 horas após a infecção, foi isolado no dia quatro e continuou sendo detectado além dos 10 dias subseqüentes.

Os sinais clínicos após a infecção natural incluem pirexia ($>39,5^{\circ}\text{C}$), descarga nasal, tosse, taquipnéia, respiração bucal e abdominal, enfisema pulmonar e subcutâneo e ocasionalmente morte. Infecções bacterianas secundárias, especialmente por *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycoplasma bovis*, são freqüentemente detectadas em surtos de BRSV. Quando não ocorrem infecções bacterianas secundárias, os animais se recuperam em duas a três semanas após a infecção.

Os achados de necropsia incluem pneumonia intersticial multifocal, enfisema alveolar disseminado com focos de atelectasia, e enfisema intersticial em graus moderados. Uma característica marcante da doença é o espessamento dos septos interlobulares. Pequenas franjas conjuntivas são evidenciadas nos bordos do pulmão e dão um aspecto fosco a essas regiões. Alguns relatos descrevem uma hipertrofia marcante do miocárdio do ventrículo direito.

As mucosas da cavidade nasal, traquéia e brônquios dos animais infectados podem apresentar-se hiperêmicas, especialmente nos estágios iniciais da infecção. O septo interlobular muitas vezes aparece espessado, devido ao edema pronunciado causado por obstrução dos brônquios, que pode levar à dispnéia severa. As porções dorsal e crânio-dorsal dos pulmões podem se apresentar normais em muitos casos, mas podem também estar marcadamente distendidas, devido ao edema e enfisema intersticial e alveolar severos. Os linfonodos regionais do trato respiratório podem estar aumentados e edematosos.

No exame histopatológico, é possível se observar células sinciciais em grande quantidade, localizadas principalmente nos bordos dos lóbulos pulmonares, nos alvéolos, bronquíolos e, por vezes, em vasos linfáticos. As células sinciciais apresentam um número variável de núcleos dispostos centralmente. Há presença de enfisema alveolar crônico com bordos de septos alveolares rompidos em forma de clava, por vezes intercalados com áreas de atelectasia, hipertrofia

da camada muscular peribronquiolar e focos de metaplasia escamosa do epitélio bronquial e bronquiolar. São observadas ainda alterações inflamatórias mononucleares com áreas focais de infiltrado eosinofílico. Bronquite, peribronquite e bronquiolite são igualmente achados histológicos característicos após a infecção natural pelo BRSV. Outras importantes alterações histopatológicas incluem o espessamento da parede alveolar, proliferação do epitélio bronquiolar com perda de cílios, epiteliação alveolar, formação de membranas hialinas, edema e exsudato nos espaços alveolares, bronquiais e bronquiolares, colapso de alvéolos, infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos.

8.1.3 Imunidade

A proteína F é considerada a mais imunogênica do BRSV, superando a proteína G na indução de anticorpos neutralizantes e na imunidade mediada por linfócitos T citotóxicos. A proteína F ainda induz a produção de anticorpos inibidores da fusão, que estão relacionados com proteção frente à infecção. A imunização de animais com as proteínas F, G e N expressas separadamente no vírus *vaccinia* conferiu proteção contra o desafio com o BRSV. Um estudo realizado em animais experimentalmente infectados demonstrou que a imunidade humoral contra a proteína F é mais duradoura e de maior intensidade do que a induzida pela proteína G. Anticorpos contra as proteínas P, M e M2 também estão presentes em infecções naturais.

Os anticorpos maternos contra as proteínas F, G e N presentes no soro de bezerros não conferem proteção frente à infecção pelo BRSV, mas podem reduzir a severidade da doença. Esses anticorpos causam um decréscimo na replicação viral nos pulmões após o desafio. A sua presença ainda suprime a resposta imune humoral local e sistêmica à infecção. Desse modo, a vacinação de animais jovens pode ser prejudicada pela presença de anticorpos maternos.

Estudos em bovinos têm demonstrado que a infecção pelo BRSV induz uma resposta imunológica predominantemente de linfócitos T auxiliares do tipo Th2, que são caracterizadas pela

produção de interleucinas (IL) 4 e 10. Estas IL estimulam a produção de anticorpos, incluindo a classe IgE, que, por sua vez, estimulam o recrutamento de eosinófilos para o parênquima pulmonar. O quadro de intensa bronquiolite evidenciado nas infecções pelo BRSV pode ser parcialmente explicado pela resposta eosinofílica.

8.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo BRSV deve se basear na detecção de antígenos virais em amostras clínicas, além da sorologia. Os métodos de escolha para a detecção de antígenos do BRSV em amostras de pulmão são as técnicas de imunofluorescência (IFA) e imunoperoxidase (IPX). O exame de secreções nasais pode se constituir em uma alternativa para o diagnóstico no animal vivo. O lavado broncoalveolar pode ser mais indicado do que os suabes nasais para a demonstração de antígenos.

A fragilidade dos vírions do BRSV torna o isolamento em cultivo celular trabalhoso e frequentemente infrutífero, requerendo repetidas passagens até o aparecimento de efeito citopático. Cuidados especiais na conservação de amostras, incluindo a coleta estéril, manutenção dos espécimes sob refrigeração (evitar o congelamento a -20°C) e envio imediato ao laboratório aumentam as chances de isolamento do vírus. Também é recomendável a coleta de suabes nasais ou lavados broncoalveolares de diferentes animais do rebanho. Em casos de necropsia, a coleta de áreas pulmonares adjacentes às áreas mais afetadas e de áreas com aspecto saudável também aumentam a probabilidade de detecção do vírus.

Para o diagnóstico sorológico, as técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) e soroneutralização (SN) têm sido amplamente utilizadas. O diagnóstico também pode ser realizado pela detecção do RNA viral em amostras clínicas por RT-PCR.

8.1.5 Controle e profilaxia

O controle da enfermidade depende de conhecimentos sobre a prevalência e epidemiologia do vírus. Os programas de controle são baseados em melhorias de manejo, biossegurança, no

controle do trânsito de animais e na utilização de vacinas.

Existe uma grande carência de vacinas protetoras contra o BRSV. Vacinas apropriadas devem ser capazes de conferir proteção mesmo na presença de anticorpos maternos, proteger contra todos os subtipos e prevenir as manifestações clínicas. Várias vacinas inativadas e atenuadas estão disponíveis comercialmente. No entanto, o desafio experimental e a campo têm demonstrado resultados inconclusivos quanto à sua eficácia. Recentemente, uma vacina, utilizando o BoHV-1 como vetor para a proteína G do BRSV, reduziu os sinais clínicos e a excreção viral após o desafio. A proteína G, como antígeno alvo de uma vacina de DNA, também apresentou sucesso frente ao desafio.

O desenvolvimento de vacinas contra as infecções pelo BRSV e HRSV foi, em parte, prejudicado por um fato inusitado ocorrido na década de 1960. O uso de uma vacina contra o HRSV, inativada pela formalina, exacerbou a enfermidade induzida pelo vírus de campo e causou mortes em um grande número de crianças. A interação com a formalina provocou alterações conformacionais nos antígenos vacinais, levando à formação de imunocomplexos que resultaram no desencadeamento de uma reação de hipersensibilidade do tipo III.

Além desses problemas, a imunidade de curta duração, conferida após a infecção natural, deixa dúvidas sobre a durabilidade da proteção conferida pelas vacinas. Outra exigência de difícil resolução é a necessidade de que a vacina induza imunidade protetora contra as diferentes variantes antigênicas encontradas a campo.

8.2 Vírus da parainfluenza bovina tipo 3

O bPIV-3 é um membro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Respirovirus*, responsável por infecções respiratórias em bovinos e ovinos. O vírus foi isolado pela primeira vez nos EUA, em 1959, a partir de secreções nasais de bovinos com sinais clínicos do quadro denominado “febre do transporte”.

Os vírions possuem sete proteínas, codificadas pelo genoma RNA de fita simples e polaridade negativa, constituído por, aproximadamente,

15.000 nt. A glicoproteína HN (hemaglutinina-neuraminidase) está envolvida na ligação aos receptores e egresso do vírus, conferindo-lhe a propriedade de aglutinar hemácias de bovinos, cobaias, suínos, humanos e aves. A proteína F está envolvida na penetração e transmissão do vírus entre células. As proteínas HN e F estão associadas com a patogenia da infecção e são responsáveis pela formação de sincícios em células de cultivo, o que constitui o efeito citopático do vírus. Essas proteínas são importantes para a indução de anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação. Além de bovinos, o vírus pode infectar naturalmente outras espécies, incluindo cães, eqüinos, macacos e humanos.

O bPIV-3 é estreitamente relacionado com o vírus da parainfluenza humana tipo 3 (HPIV-3), apresentando semelhanças genéticas e antigênicas importantes. Estudos de proteção demonstraram aproximadamente 25% de neutralização cruzada entre esses vírus.

8.2.1 Epidemiologia

A distribuição do bPIV-3 é mundial e a prevalência de anticorpos específicos é alta na população bovina. No Brasil, a infecção é endêmica com altas taxas de soropositividade nos rebanhos. Estudos realizados no RS indicam uma prevalência de anticorpos superior a 80% em gado de leite e corte, demonstrando a ampla disseminação do agente. Apesar das evidências sorológicas da presença do vírus no Brasil, raramente tem sido relatado o isolamento do agente. O vírus foi isolado de um animal com doença respiratória no RS e de um surto de abortos em bovinos no estado de Goiás. A prevalência alta da infecção, associada aos raros relatos de doença respiratória nos rebanhos, sugere que a maioria das infecções é inaparente.

A disseminação do vírus no rebanho ocorre aparentemente por contato direto e indireto. Fatores predisponentes para a infecção incluem o estresse (vacinação, desmame, transporte), excesso de lotação e ventilação inadequada, especialmente em rebanhos leiteiros estabulados. Os ovinos também são susceptíveis à infecção e, possivelmente, participam da epidemiologia da

infecção, atuando como disseminadores do vírus para os bovinos.

A doença é caracterizada por baixa morbidade; a mortalidade é rara. Taxas mais altas de morbidade e mortalidade podem ocorrer em casos de co-infecções com agentes virais ou bacterianos. A faixa etária mais afetada é a de dois a seis meses de idade, acompanhando o declínio da imunidade passiva. No entanto, já foram relatados casos em animais mais jovens.

8.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a penetração pelas vias aéreas superiores, o vírus replica no epitélio nasal, faríngeo e traqueal. Durante a infecção do trato respiratório inferior, o vírus pode infectar pneumócitos do tipo II, causando lesões nos alvéolos pulmonares.

Em infecções naturais, os sinais clínicos mais freqüentemente observados são: dispnéia, tosse, descarga nasal serosa ou mucopurulenta, lacrimejamento, conjuntivite, inapetência e temperatura elevada. Esses sinais são típicos da febre do transporte. Em bezerros infectados experimentalmente, a doença é caracterizada por febre, hipertermia, lacrimejamento, descarga nasal serosa abundante, depressão, dispnéia e tosse. Muitos animais apresentam sinais brandos, recuperando-se em poucos dias, porém a infecção pode resultar em pneumonia intersticial, afetando geralmente os lobos pulmonares anteriores. Sons de crepitação em lobos pulmonares diafragmáticos podem ser auscultados em casos mais graves, com presença de enfisema. A doença geralmente evolui para a cura espontânea. No entanto, um tratamento de suporte para possíveis infecções secundárias, incluindo antibióticos, pode ser necessário em casos mais graves. O aborto é uma consequência esporádica da infecção em vacas gestantes.

Os achados de necropsia incluem pneumonia exsudativa, que atinge preferencialmente as porções craniais e ventrais dos lobos pulmonares. Bronquite e bronquiolite com infiltrado plasmocitário estão presentes ao exame histopatológico. Hiperplasia e necrose do epitélio bronquiolar

também podem ser observadas. A infecção provavelmente induz uma imunossupressão localizada, o que favorece a instalação de infecções bacterianas secundárias.

8.2.3 Imunidade

Anticorpos com atividade neutralizante, especialmente da classe IgG2, e anticorpos inibidores da hemaglutinação são detectáveis no soro de animais convalescentes. A proteção contra o aparecimento de sinais clínicos induzidos por reinfecções pelo bPIV-3 está associada com altos títulos de anticorpos neutralizantes e presença de resposta imune celular de memória. A imunidade de mucosas, especialmente aquela mediada por IgA, parece ser importante na proteção contra reinfecções. No entanto, a imunidade é geralmente passageira, e os animais podem se tornar suscetíveis à reinfecção após alguns meses.

8.2.4 Diagnóstico

O bPIV-3 deve ser considerado em casos de doença respiratória em bovinos jovens. A suspeita clínica deve ser confirmada por testes laboratoriais. O diagnóstico laboratorial baseia-se no isolamento do vírus em cultivo celular, a partir de secreções nasais de animais doentes. O vírus pode ser recuperado de secreção nasal de 7 a 9 dias pós-infecção. O vírus produz citomegalia, arredondamento celular e formação de sincícios em células primárias ou de linhagem bovina, efeito característico dos membros da família *Paramyxoviridae*.

A identificação do vírus pode ser realizada por IFA de células inoculadas com o material suspeito. O método clássico de identificação é a hemaglutinação (HA) com eritrócitos de cobaias, seguida de inibição da hemaglutinação (HI) com anti-soro específico. Outro método clássico de diagnóstico é a reação de hemadsorção em cultivo celular. As técnicas moleculares (RT-PCR) têm sido utilizadas para a detecção do agente e seus produtos. A sorologia pareada também pode auxiliar o diagnóstico da infecção aguda. As técnicas de eleição para a sorologia são a HI com eritrócitos de cobaias, a SN e ELISA.

8.2.5 Controle e profilaxia

A prevenção da enfermidade deve se basear em medidas de higiene, manejo, controle do trânsito de animais, quarentena e vacinação. Vacinas vivas e inativadas estão disponíveis para o controle das infecções pelo bPIV-3. Essas vacinas geralmente contêm outros agentes virais e bacterianos associados com doença respiratória em bovinos. A relação custo-benefício do seu uso em situações epidemiológicas em que a doença é rara, como no Brasil, deve ser considerada. Atividades de manejo que evitem a superlotação, cuidados com mudanças bruscas de temperatura e administração adequada de colostro podem auxiliar na prevenção da doença.

8.3 Vírus da peste bovina

A peste bovina (*rinderpest*) foi descrita pela primeira vez na Ásia, no século IV. A doença é causada por um *Morbillivirus* que, nos séculos XVIII, XIX e XX, causou epidemias devastadoras na Europa e na África subsaariana. Um surto ocorrido, em 1920, na Europa, motivou a criação da OIE (*Office International des Epizooties*) em Paris. Casos da doença foram relatados em regiões da África, do Oriente e da Ásia, no entanto está em processo de erradicação nesses locais. Acredita-se que outros morbilivírus, como o CDV e o vírus do sarampo, tenham se originado a partir do vírus da peste bovina há mais de 5.000 anos. Os vírions são sensíveis a maioria dos desinfetantes (fenol, hidróxido de sódio, solventes lipídicos, entre outros), mantêm a viabilidade por longos períodos em tecidos congelados e são estáveis sob pH 4 a 10.

Esse vírus pode infectar todas as espécies da ordem *Artiodactyla*, incluindo ovinos, caprinos, suínos, cervídeos, camelos, antílope africano, hipopótamos e outros animais selvagens. Os bovinos e búfalos estão envolvidos com maior frequência nos surtos da doença febril e fatal, mas a doença é menos severa nas outras espécies. Em suínos, a infecção pode ser assintomática e, em áreas endêmicas, pode-se observar doença mais branda em bovinos e búfalos. A morbidade em

populações susceptíveis é de aproximadamente 100%, e a mortalidade pode atingir 90 a 100%.

A transmissão do vírus dá-se pela ingestão e/ou contato com água e alimentos contaminados com excreções e secreções de animais infectados. O agente penetra no hospedeiro provavelmente pela via oral e/ou nasal. Dois dias antes de apresentar sinais clínicos, os animais já excretam o vírus em grande quantidade. O vírus replica inicialmente em linfonodos faríngeos, mandibulares e tonsilas, disseminando-se pelo organismo por viremia. Após um período de incubação de três a cinco dias, os animais apresentam hipertermia. A fase de lesões nas mucosas ocorre em seguida, com inflamação e erosões na mucosa dos tratos digestivo e respiratório, descarga nasal mucopurulenta e diarreia aquosa, às vezes, com sangue. São observados, ainda, arqueamento do posterior e rápida perda de peso, leucopenia e imunossupressão. Fêmeas prenhes podem abortar. Durante a necropsia, observa-se necrose das placas de Peyer, congestão e hemorragias no epitélio intestinal, aumento e edema nos linfonodos e erosões nas mucosas oral e nasal.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado a partir de urina, sangue, secreções nasais, orais e fezes coletadas de animais doentes; ou de linfonodos e baço coletados de animais recentemente mortos. Em áreas endêmicas, o diagnóstico frequentemente é realizado pelos sinais clínicos severos.

O isolamento e identificação do vírus podem ser realizados pela inoculação do material suspeito em células primárias ou de linhagem de origem bovina, ovina, suína e também em células Vero. A inoculação de ovos embrionados ou de animais de laboratório (coelhos, camundongos e cobaias) também pode ser realizada. A detecção de antígenos por IFA, IPX, imunoeletroforese ou imunodifusão em gel de ágar (IDGA) também é indicada. A detecção do RNA viral por RT-PCR representa uma alternativa rápida e sensível de diagnóstico. Técnicas sorológicas (ELISA, SN) podem ser empregadas no soro de animais que sobreviveram por um período suficiente para produzir anticorpos.

Em países livres, a prevenção e o controle da doença são direcionados para evitar a intro-

dução do agente. Quarentena, o abate de animais suspeitos e proibição da importação de produtos de origem animal não-cozidos de áreas de risco são as medidas adotadas em áreas livres. A peste bovina é uma doença de notificação obrigatória, segundo a OIE. Vacinas atenuadas são aplicadas em animais nas áreas em que a doença é endêmica, e a imunidade pode permanecer por vários anos.

8.4 Vírus da peste dos pequenos ruminantes

A peste dos pequenos ruminantes (*pest des petit ruminants*) é uma doença sistêmica e contagiosa de ovinos e caprinos, clinicamente semelhante à peste bovina. A doença é causada por um *Morbillivirus* (PPRV) relacionado antigenicamente com o vírus da peste bovina. No entanto, ao contrário da peste bovina, grande parte das infecções por este vírus é subclínica. A infecção tem sido descrita no oeste da África, na Península Arábica, Oriente Médio e na Índia. Além dos ovinos e caprinos, espécies de ungulados selvagens e uma espécie de cervídeo (*Odocoileus virginianus*) são susceptíveis ao vírus. Os bovinos e suínos geralmente desenvolvem infecções inaparentes. Em áreas endêmicas, a peste dos pequenos ruminantes é uma importante causa de impacto econômico.

A transmissão do vírus ocorre por contato direto ou indireto com excreções e secreções de animais infectados, pelas vias oral e/ou nasal. Durante um período de incubação de três a dez dias, o vírus replica nos linfonodos regionais e produz viremia. Na viremia, que dura dois ou três dias, o vírus se dissemina para o baço, medula óssea, trato gastrointestinal e respiratório, além dos tecidos linfóides. Os sinais clínicos incluem hipertermia, anorexia, letargia, gengivite, estomatite, conjuntivite, diarreia e desidratação. Abortos podem ocorrer em fêmeas prenhes. Broncopneumonia, com infecções secundárias, também pode ser observada. Na necropsia, observa-se estomatite erosiva necrosante na mucosa oral, conjuntivite catarral profusa, áreas de necrose na mucosa nasal, erosões e hemorragias no intestino, necrose e ulceração nas placas de

Peyer, congestão e aumento de volume no baço e nos linfonodos. Vulvovaginite erosiva, pleurite e hidrotórax também têm sido descritos.

O diagnóstico laboratorial da infecção pode ser realizado a partir de secreções (oral, nasal e ocular), sangue, linfonodos mesentéricos, baço, pulmões e linfonodos bronquiais. Para a detecção de antígenos virais, utilizam-se as técnicas de IDGA, imunoeletroforese, IFA, ELISA e IPX. O isolamento viral pode ser realizado em células primárias de rim bovino e na linhagem Vero. A detecção de partículas virais por ME e a amplificação de RNA por RT-PCR também podem ser utilizadas, além de testes sorológicos como a SN, ELISA e IDGA.

Algumas vacinas têm sido utilizadas para limitar a disseminação da infecção. O controle é baseado em medidas para impedir a introdução de animais infectados em áreas livres.

8.5 Vírus da cinomose

A infecção pelo vírus da cinomose (CDV) ocorre em canídeos domésticos e selvagens, além de outros mamíferos das famílias *Felidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae* e *Viverridae*. Porém, a sua maior importância na rotina veterinária está relacionada com as manifestações clínicas em cães domésticos. O CDV é um membro do gênero *Morbillivirus* e é antigenicamente relacionado com o vírus do sarampo, com o vírus da peste dos pequenos ruminantes e com o vírus da peste bovina, estes dois últimos ainda não relatados no Brasil. A cinomose apresenta sinais clínicos sistêmicos, que podem ser acompanhados de sinais neurológicos.

Os vírions do CDV possuem as proteínas F e H no envelope, e a proteína H é a responsável pelo tropismo do vírus no organismo, possuindo função importante na sua neuroinvasividade. O envelope lipoprotéico viral é facilmente destruído por desinfetantes, e o vírus é muito sensível às condições ambientais de temperatura e radiação solar.

Somente um sorotipo do CDV tem sido descrito, porém tem sido demonstrado que os isolados de campo apresentam uma variabilidade antigênica considerável. Os isolados do CDV

também apresentam variações de patogenidade e virulência nos hospedeiros.

8.5.1 Epidemiologia

A infecção pelo CDV é enzoótica no mundo inteiro, com a doença ocorrendo com maior frequência em cães jovens não-vacinados. Falhas vacinais, associadas com esquemas de vacinação inadequados ou mesmo com vacinas comerciais de baixa qualidade, podem resultar na ocorrência de doença mesmo em cães vacinados. Em outros países a situação é semelhante. Países desenvolvidos que reduziram a incidência da doença pela vacinação massiva ainda apresentam surtos esporádicos de cinomose.

O contato direto com as secreções nasais, orais e urina de animais infectados se constitui na principal forma de transmissão do CDV. A disseminação do vírus a curtas distâncias por aerossóis também parece ocorrer com certa frequência. A transmissão por fômites e no ambiente nosocomial também tem sido descrita. Após a infecção, os animais excretam o vírus nos fluidos corporais por períodos prolongados.

Grande parcela dos cães infectados não desenvolve a forma clínica da infecção. Entretanto, existem amostras de CDV com vários níveis de patogenidade. Este fato, associado com fatores do hospedeiro, como idade, *status* imunológico e infecções secundárias, podem influenciar na manifestação das diferentes formas clínicas da doença.

Outro aspecto importante da biologia do CDV é a gama crescente de espécies de mamíferos que se infectam naturalmente. Os danos ecológicos associados com essas infecções puderam ser observados nos surtos de cinomose com elevadas taxas de mortalidade em leões e hienas no Parque Nacional do Serengeti (Tanzânia, continente africano). A infecção pelo CDV é fatal também para outros animais domésticos, como os furões. A infecção de gatos domésticos parece não ser patogênica, embora o CDV possa causar doença grave em grandes felinos selvagens. O controle desse vírus se torna difícil pelo grande número de espécies selvagens que podem ser infectadas, incluindo animais da família *Canidae* (lobos, ra-

posas, coiotes, dingo e chacal), *Procyonidae* (mão-pelada, coati e panda), *Mustelidae* (ferret, marta, texugo, cangambá e lontra), *Viverridae* (civet) e da família *Felidae* (leopardo, leões, tigres e guepardos). Surto de enfermidade com alta mortalidade em focas e outros mamíferos marinhos têm sido descritos no mar Mediterrâneo e atribuídos ao CDV e a outros vírus relacionados.

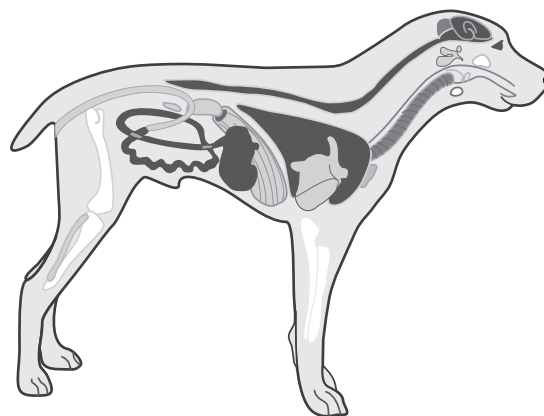
8.5.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a inalação das partículas víricas, o CDV replica no epitélio e em macrófagos do trato respiratório superior e, a seguir, alcança os linfonodos regionais. Em um período de até uma semana após a infecção, o vírus é carregado por linfócitos e se dissemina pelos órgãos linfóides. Essa fase é denominada viremia primária, e é responsável pelo primeiro pico febril. A progressão da infecção depende da resposta imune do animal. A maioria dos cães desenvolve uma resposta imune celular e humoral eficaz e não manifesta sinais clínicos da doença. Os cães infectados que não conseguem montar uma resposta eficiente acabam por apresentar a doença em diferentes níveis de gravidade, em até três semanas após a infecção. Nestes animais, o vírus é carregado por linfócitos e monócitos, produzindo a viremia secundária (segundo pico de febre) e se disseminando para a pele e para os tratos digestivo, respiratório, urogenital e sistema nervoso. As manifestações clínicas apresentam correlação com os órgãos e/ou tecidos afetados. A patogenia da infecção pelo CDV está ilustrada na Figura 26.4.

Células mononucleares carregam o CDV para o SNC, por diferentes vias: através da barreira hematoencefálica, pelo fluido cefalorraquidiano e/ou pelo epêndima dos ventrículos. A grande variedade de sinais neurológicos da cinomose está relacionada com as lesões multifocais no SNC. Os sítios de predileção do vírus são: a substância branca do cerebelo, periventricular e ao redor do quarto ventrículo, a medula óssea e a via óptica. Geralmente, a desmielinização é a lesão predominante, decorrente da replicação viral na substância branca. Alguns estudos de-

monstram que, inicialmente, a infecção pelo CDV promove uma disfunção metabólica nas células que produzem a mielina. No entanto, durante a inflamação crônica, as lesões são decorrentes do processo inflamatório, com a destruição dessas células por macrófagos e por anticorpos.

A infecção do sistema reticuloendotelial e de linfonodos é caracterizada pela hiperplasia e formação de células gigantes multinucleadas nesses órgãos. No SNC, ocorre encefalite não-supurativa. No sistema respiratório, pode ser observada pneumonia intersticial. A detecção de corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos e intranucleares, denominados corpúsculos de Lenz, pode ser realizada nos tecidos em que ocorreu a replicação viral. Essas inclusões são detectadas com maior frequência em células sangüíneas, astrócitos, neurônios e no epitélio da bexiga, associadas com desmielinização e altera-



Fonte: adaptada do site: www.bakerinstitute.vet.cornell.edu.

Figura 26.4. Patogenia da cinomose canina. O CDV penetra geralmente pela via oronasal e replica inicialmente nos epitélios e em macrófagos das vias aéreas superiores, faringe e tonsilas. A replicação primária é seguida de viremia que permite a disseminação sistêmica do vírus e infecção de uma variedade de linfonodos e acúmulos linfóides, levando a um quadro de imunossupressão. Em cães que não conseguem montar uma resposta imune eficiente, o vírus produz uma viremia secundária, dissemina-se e replica em vários tecidos, incluindo células epiteliais da pele, dos tratos digestivo, respiratório e urinário, no sistema nervoso central (SNC) e no sistema reticuloendotelial. Esses animais podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas, relacionadas com os órgãos e tecidos afetados. A incapacidade de erradicar o vírus pode resultar em persistência viral no SNC.

ções em astrócitos no sistema nervoso. Infiltrado mononuclear perivascular pode ser observado na substância cinzenta do SNC. Na necropsia, o cérebro apresenta malácia e, ao exame microscópico, o cerebelo e porções mais basais do encéfalo apresentam lesões de necrose; raramente o córtex é atingido.

A forma aguda da doença é mais comum em animais com idade entre quatro e seis meses, pela perda da imunidade passiva. Observa-se apatia, secreção nasal e ocular serosa a seromucosa e imunossupressão. A infecção na pele produz pústulas abdominais e, no tegumento, resulta em hiperqueratose do focinho e das almofadas plantares, causada pela infecção das células basais do epitélio. A replicação viral no sistema respiratório inferior, quando associada com infecções bacterianas secundárias, pode causar pneumonia intersticial. Conjuntivite purulenta é outro achado freqüente. Diarréia com fezes amolecidas é observada pela infecção do trato digestório. A doença hiperaguda se manifesta com sinais graves de ataxia e alterações do comportamento em cães jovens, sendo associada com a vacinação com patógenos imunossupressores, como o parvovírus canino (CPV-2), ou mesmo pela reversão da vacina atenuada à virulência.

O CDV pode produzir uma infecção grave do SNC, caracterizada por encefalite e desmielinização. Essa patologia pode estar associada ou não com as manifestações sistêmicas e caracteriza-se por inflamação da substância cinzenta no cérebro e cerebelo. Além da forma aguda, uma forma crônica progressiva da enfermidade é reconhecida em cães adultos (três a oito anos de idade). Nestes casos, as alterações são restritas ao SNC. Os sinais neurológicos, também presentes na forma aguda, incluem hipersalivação, mioclonias, tremores, incoordenação, diminuição dos reflexos pupilares, paresia do posterior, que pode evoluir para tetraplegia. Outros sinais mais graves podem ocorrer, incluindo epilepsia, delírio e vocalizações, estupor e coma. Outra forma de apresentação da cinomose é a encefalite do cão velho, que geralmente acomete cães com idade superior a oito anos.

Manchas marrom-escuras circundando o esmalte dos dentes de animais infectados ainda filhotes também são achados relativamente freqüentes. Essa alteração é resultante da infecção

das células que produzem o esmalte e é denominada hiperplasia de esmalte. A infecção de cadelas prenhes pode resultar em transmissão transplacentária do vírus, podendo causar abortos, natimortos, nascimento de filhotes fracos e imunossuprimidos.

8.5.3 Imunidade

A sobrevivência do animal depende fundamentalmente do desenvolvimento de uma resposta imune celular efetiva. A resposta imune humoral também é importante, pois cães com títulos medianos de anticorpos (entre 16 e 64) parecem estar protegidos contra a doença aguda. Títulos de anticorpos inferiores a 16 não protegem os cães, porém interferem com o sucesso da vacinação. A imunidade passiva declina entre a 8ª e 14ª semanas de vida dos filhotes, deixando-os susceptíveis à infecção. Antes disso, a imunidade passiva pode comprometer o sucesso da vacinação, pela inativação do vírus vacinal pelos anticorpos. Diferenças antigênicas entre isolados de campo e cepas vacinais têm sido implicadas como causa de falhas vacinais. Essas falhas resultam na ocorrência de cinomose mesmo em cães vacinados.

8.5.4 Diagnóstico

A ocorrência de lesões cutâneas e doença respiratória em cães jovens, associadas ou não com sinais neurológicos, são sugestivos de cinomose. Uma linfopenia pode estar presente no hemograma de animais doentes.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela detecção de antígenos do CDV em esfregaços de células da conjuntiva ou de fossas nasais, na capa flogística e no sedimento urinário pelas técnicas de IFA e IPX ou, ainda, pela detecção do genoma viral nessas amostras por RT-PCR.

O isolamento viral não é muito utilizado para o diagnóstico, pois o CDV necessita de adaptação aos cultivos celulares por várias passagens. O vírus replica em células primárias e de linhagem de origem canina, como a MDCK, e de furões (*ferrets*). Outras células susceptíveis incluem a linhagem Vero e fibroblastos de embrião de galinha.

Partículas virais podem ser detectadas nas fezes por microscopia eletrônica. O diagnóstico *post-mortem* pode incluir as técnicas descritas acima, para a detecção de antígenos virais nos tecidos, e ainda a histopatologia.

O diagnóstico sorológico em um único teste não possui significado clínico. Este apenas terá importância se realizado em amostras pareadas de soro. Kits de ELISA, para detecção de IgM, têm sido utilizados em clínicas, e o resultado positivo é indicativo de infecção presente ou recente.

8.5.5 Controle e profilaxia

A vacinação com cepas atenuadas do CDV, em formulações mono ou polivalentes, é a estratégia mais utilizada no combate a cinomose. Em

geral, as vacinas inativadas não induzem resposta satisfatória; porém novos testes realizados com adjuvantes têm surtido resultados promissores. Vacinas vivas, contendo o vírus atenuado do sarampo, são utilizadas com relativo sucesso em países da Europa. Essas vacinas não sofrem a interferência da imunidade passiva. Vacinas com vírus vivo modificado e vacinas recombinantes, utilizando um poxvírus aviário como vetor do DNA complementar (cDNA) dos genes das proteínas H e F do CDV, estão disponíveis comercialmente (Figura 26.5). Recomenda-se a primovacinação aos 60 dias de idade, três reforços mensais e revacinação anual. Para filhotes oriundos de mães sabidamente não-imunizadas e também em situações de risco (canis, colônias, *pet shops*), pode-se antecipar a primovacinação. O

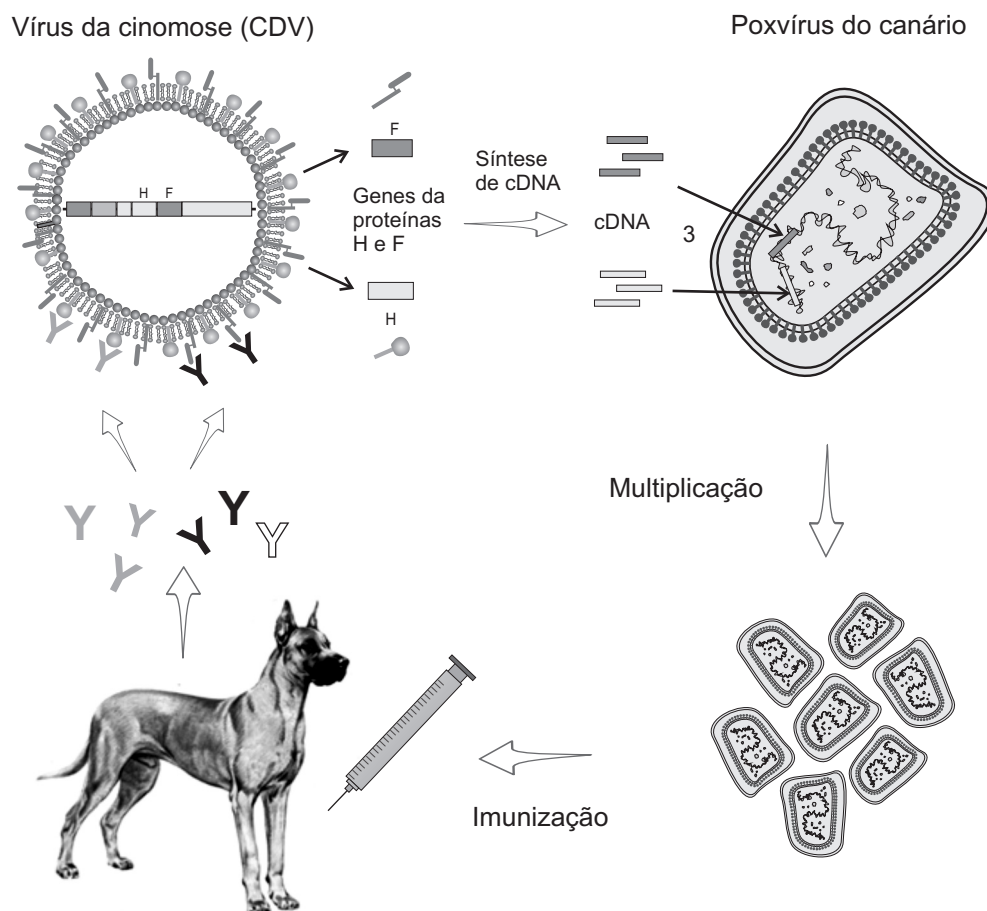


Figura 26.5. Vacina recombinante contra o vírus da cinomose (CDV). Os genes das glicoproteínas H e F são sintetizados como cDNA e inseridos no genoma do poxvírus do canário. Este vírus vetor é amplificado em cultivo celular e, então, utilizado para imunizar os cães, nos quais expressa as proteínas heterólogas. Os cães imunizados desenvolvem resposta imunológica contra as proteínas do vírus vetor e contra as glicoproteínas H e F, conferindo proteção contra o CDV.

sucesso das vacinas disponíveis depende da variabilidade antigênica existente entre isolados do CDV, além da qualidade dos imunógenos e da resposta dos indivíduos vacinados.

A indução de encefalite após a vacinação com as vacinas vivas disponíveis está associada com a imunossupressão. Os sinais neurológicos geralmente ocorrem entre 7 e 14 dias após a administração da vacina, porém o grau de imunossupressão e a presença de outras infecções podem agravar o quadro, tornando-o sistêmico. Deve-se evitar a vacinação de fêmeas lactantes em contato com seus filhotes não-imunizados, especialmente aquelas sem histórico de vacinação. Deve-se também evitar o contato de filhotes com outros cães até a segunda imunização. Alguns estudos têm demonstrado que as revacinações poderiam ser realizadas em intervalos maiores que um ano, pois os cães vacinados apresentam títulos duradouros contra o vírus homólogo.

As pessoas envolvidas nos cuidados ambulatoriais com animais doentes devem utilizar medidas de proteção (luvas descartáveis, esterilização e descarte de fômites, higiene pessoal e do ambiente com desinfetantes), associadas com o isolamento dos animais, prevenindo a disseminação da enfermidade no ambiente residencial e nosocomial.

Diversos protocolos terapêuticos, incluindo a suplementação com vitamina B, aplicação de corticosteróides, soro hiperimune, drogas antivirais e outros medicamentos têm sido utilizados para minimizar os efeitos da infecção neurológica. Porém, nenhum desses protocolos demonstrou eficiência comprovada sobre o desfecho da enfermidade. A cinomose permanece sendo uma doença de prognóstico desfavorável, com altas taxas de mortalidade, dependendo da cepa viral e da idade dos cães. Muitos animais que se recuperam da doença aguda permanecem com sequelas neurológicas graves.

8.6 Vírus da parainfluenza canina tipo 2

O vírus da parainfluenza canina tipo 2 (CPIV-2) é um membro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, classificado no gênero *Rubulavirus*, assim como o vírus da ca-

xumba. O CPIV-2 possui relação antigênica com o vírus dos símios tipo 5 (SV-5) e com o HPIV-2. Em associação com outros agentes, como a *Bordetella bronchiseptica*, o adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), o herpesvírus canino (CHV-1), o reovírus canino (CRV) e o *Mycoplasma* sp., o CPIV-2 tem sido envolvido na etiologia da doença conhecida como *traqueobronquite infecciosa canina* ou tosse dos canis. O CPIV-2 foi isolado pela primeira vez, em 1967, nos Estados Unidos, a partir de amostras clínicas de cães com essa doença.

8.6.1 Epidemiologia

Estima-se que 70% dos cães urbanos possuam anticorpos contra o CPIV-2. Esse vírus, assim como os outros agentes da traqueobronquite infecciosa canina, dissemina-se por via aérea e pelo contato direto ou indireto. A transmissão ocorre principalmente em ambientes de convívio entre cães, com superpopulação e estresse. Reinfecções com ou sem sinais clínicos podem ocorrer com frequência.

A infecção apresenta distribuição mundial. Não existem dados publicados sobre a prevalência de anticorpos ou isolamento do vírus no Brasil. No entanto, doença com sinais clínicos semelhantes aos da tosse dos canis são frequentes na rotina clínica, principalmente no inverno e afetando cães com idade entre seis meses e um ano.

8.6.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Após a transmissão, o vírus replica no epitélio da nasofaringe e se dissemina pelo trato respiratório, infectando o epitélio pseudo-estratificado da traquéia, onde se desencadeia um processo inflamatório. Nesse período, entre um e seis dias após a infecção, iniciam os sinais clínicos. Os sinais mais frequentes incluem tosse seca e ruidosa, engasgos, letargia, apatia, conjuntivite e tonsilite. A recuperação geralmente ocorre entre 7 e 14 dias.

Em casos mais severos, pode ocorrer hipertermia, apatia e perda do apetite, com pneumonia e tosse produtiva, decorrentes de infecções bacterianas secundárias. Na presença de infecção

secundária por *Bordetella* sp., o quadro clínico pode persistir por até 30 dias.

A encefalite pelo CPIV-2 em caninos e outros animais, tais como ferrets, é geralmente desconsiderada na prática clínica. No entanto, existem evidências do envolvimento deste agente em doença com sinais neurológicos indistinguíveis aos da cinomose.

8.6.3 Imunidade

A infecção induz a rápida produção de anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação. Imunidade humoral de mucosas (mediada por IgA secretória), além da celular, são importantes para minimizar os sinais da infecção pelo CPIV-2, protegendo contra novas exposições ao agente.

8.6.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico baseia-se nos sinais clínicos e deve ser confirmado por exames complementares, como a radiografia torácica (espessamento da traquéia e de brônquios), hemograma e bioquímica sérica.

O diagnóstico laboratorial específico pode ser realizado pelo isolamento do vírus a partir de secreções de animais doentes em células de linhagem caninas. A presença de antígenos virais em secreções nasais pode ser evidenciada pela técnica de IFA. Como a traqueobronquite é uma doença multicausal, deve-se também investigar a presença de outros agentes concomitantes, determinando-se ainda o prognóstico da doença.

8.6.5 Prevenção e controle

O uso de antiinflamatórios não-esteroidais e xaropes auxiliam na recuperação do animal. A administração de antibióticos eficazes contra *Bordetella* spp., tais como sulfas e quinolonas, minimizam as infecções secundárias. Outras medidas de suporte, como alimentação adequada, repouso e evitar a exposição ao frio também são importantes na recuperação.

Vacinas vivas e inativadas contra o CPIV-2 e outros agentes da tosse dos canis são comercializadas, para aplicação intranasal e parenteral, respectivamente. As vacinas atenuadas conferem imunidade de mucosas, porém o cão pode apresentar sinais clínicos brandos da doença após a vacinação. A primovacinação deve ser realizada aos 60 dias de idade, seguida por três reforços mensais. Uma dose anual de reforço é recomendada. A vacinação não previne a infecção nem os sinais clínicos, mas a doença em animais vacinados é geralmente mais branda. A ventilação adequada de canis, higienização adequada e a prevenção de superpopulação são importantes na prevenção da disseminação da infecção.

8.7 Metapneumovírus aviários

Os metapneumovírus aviários (AmPVs), como o pneumovírus aviário (APV) e o vírus da rinotraqueíte dos perus (*turkey rhinotracheitis virus*, TRV) estão associados com infecções agudas do trato respiratório superior de perus e com doença respiratória e a síndrome da cabeça inchada em galinhas.

O APV, que anteriormente era classificado no gênero *Pneumovirus*, foi reclassificado dentro do gênero *Metapneumovirus* por apresentar o genoma com oito genes organizados em uma ordem diferente dos outros 10 gêneros de pneumovírus de mamíferos. Esses vírus não apresentam atividade hemaglutinante e de neuraminidase, sendo incapazes de aglutinar eritrócitos de mamíferos e aves. São sensíveis ao éter, clorofórmio e são inativados a 56°C por 30 minutos.

As glicoproteínas F e G do APV são as mais imunogênicas. A glicoproteína G é a proteína mais variável dos vírions, e estudos da sua sequência em diferentes isolados evidenciam a existência de subgrupos distintos. As proteínas N e F são essenciais para a replicação do vírus e são altamente conservadas entre os diferentes isolados e entre os diferentes subgrupos de PVA. Inicialmente, acreditava-se que havia apenas um sorotipo de PVA, contendo dois subgrupos (A e B) que podiam ser diferenciados pela análise da sequência de nucleotídeos ou por anticorpos mo-

noclonais. Posteriormente foram identificados quatro subgrupos distintos (A, B, C e D), sendo os tipos A e B os mais prevalentes. O subgrupo C foi identificado apenas nos Estados Unidos da América; e o subgrupo D surgiu isoladamente em um surto de rinotraqueíte em perus na França.

Os primeiros relatos da doença causada pelo APV em produções avícolas datam do final dos anos 70, na África do Sul, associados com rinotraqueíte em perus. Esse quadro, popularmente conhecido na África do Sul como *Dikkop* (cara inchada), foi denominado posteriormente de síndrome da cabeça inchada (SHS).

No início da década de 1980, a ocorrência concomitante de um surto de doença respiratória em perus e de SHS em galinhas de propriedades próximas levou a suspeita de que a rinotraqueíte dos perus e a SHS possuíam a mesma etiologia. O APV possui distribuição mundial e surtos e sorologia positiva já foram relatados em vários países, tanto em perus como em galinhas de corte e poedeiras.

8.7.1 Epidemiologia

A origem do APV ainda é obscura, embora os primeiros relatos da doença na África do Sul sugiram que o vírus possa ser um patógeno natural de aves silvestres daquele país.

Estudos realizados no Brasil, em 1992, indicaram uma prevalência de 65-70%. Estudos posteriores detectaram anticorpos para o APV em frangos de corte, matrizes e poedeiras nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, demonstrando a ampla distribuição da infecção no país. O isolamento do APV foi realizado a partir de perus e galinhas comerciais com sinais respiratórios; e os isolados foram identificados como pertencentes ao subgrupo A.

As perdas econômicas devido a SHS em frangos de corte situam-se em torno de 1 a 3% em condições favoráveis; e de 20 a 30% quando ocorrem complicações respiratórias ou infecções bacterianas secundárias.

A transmissão do APV ocorre por contato direto e indireto entre aves, por aerossóis e através de ração, água e cama contaminados. A transmissão é geralmente associada ao contato íntimo com superfícies contaminadas bem como a fato-

res ambientais favoráveis. Em condições de baixa umidade, má ventilação, calor intenso e poeira, a disseminação da doença entre galinhas criadas em cama é rápida (cerca de 24 horas). No caso de aves criadas em gaiolas, em boxes ou galpões separados, a disseminação da doença pode ser lenta (cerca de 1 a 2 semanas).

As aves mais susceptíveis são os perus jovens e as matrizes pesadas, principalmente na primeira semana de produção, seguido de frangos de corte e poedeiras. O curso da SHS em galinhas varia de cinco a dez dias, sendo no máximo de seis semanas, com morbidade extremamente variável (1% a 90%). A morbidade e mortalidade variam de acordo com a presença e o tipo de agente secundário, sistema de criação, manejo e condições ambientais. No caso de frangos de corte, dependendo do agente secundário, a mortalidade pode atingir 20% do plantel. Já entre matrizes, a mortalidade varia de 1 a 5% e se restringe àquelas que apresentam a cara inchada.

Em perus, o período de incubação é de aproximadamente três a cinco dias. A disseminação do APV em plantéis de perus ocorre de forma rápida, sendo que, em 24 a 48 horas, todo o plantel pode estar contaminado, e poucos animais são poupados da infecção. A infecção pode durar de sete a dez dias, observando-se um abrandamento gradativo dos sinais clínicos. A rinotraqueíte dos perus apresenta-se de forma aguda e muito contagiosa. A morbidade em perus é elevada, podendo chegar a 100%. A mortalidade é variável, dependendo da presença de infecções bacterianas secundárias.

8.7.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

O vírus replica inicialmente nas células epiteliais ciliadas que revestem a mucosa dos condutos nasais, laringe e traquéia. Com a infecção, as células perdem a atividade ciliar. Em perus, podem-se observar inclusões citoplasmáticas eosinofílicas nessas células.

O vírus já está presente no trato respiratório entre quatro e seis dias antes do aparecimento dos sinais clínicos. O APV alcança o oviduto através da corrente circulatória, após a replicação

primária no trato respiratório, e replica no epitélio do trato reprodutivo. Os sinais clínicos provavelmente são reflexos dos danos provocados pela multiplicação do vírus no epitélio ciliado, tanto na traquéia como no trato reprodutivo.

Acredita-se que a maioria das infecções seja assintomática ou restrita a sinais clínicos leves (aumento de secreções e espirros devido a um processo de hiperplasia glandular). Isto se deve ao fato de que, em condições normais, há uma reposição eficiente das células que revestem as mucosas. Fatores que comprometem a habilidade de reparação epitelial ou que contribuem para um aumento da atividade secretória, como o estresse, poeira, concentração de gases ambientais, deprimem as defesas locais ou o sistema BALT (tecido linfóide associado aos brônquios), permitindo a instalação de agentes bacterianos secundários. Isto leva a um processo inflamatório intenso, principalmente nos condutos naso-lacrimais, nos quais se observa secreção muco-catarral, lacrimejamento e blefarite. A persistência de colonização bacteriana leva ao acometimento do tecido subcutâneo da região submandibular do tecido ósseo do crânio e, ao final, à afecção das meninges, que é a fase que caracteriza a SHS.

As principais alterações histopatológicas demonstram inicialmente uma injúria do epitélio respiratório, com redução da atividade ciliar, e, finalmente, uma perda progressiva dos cílios, congestionamento subepitelial e hiperplasia das células epiteliais. Nas células ciliadas, são observados corpúsculos citoplasmáticos acidófilos. Frequentemente são observadas celulite, periostite e osteomielite dos ossos da cabeça. Em muitos casos, ocorrem também otite externa e interna e meningite.

No cérebro, observam-se gliose, hiperemia, concentração perivascular de leucócitos e em menor grau, hemorragias. Alterações degenerativas podem ser observadas somente nas células de Purkinje do cerebelo. Também são observados hiperemia renal e glomerulonefrite. As aves infectadas apresentam uma degeneração marcante dos folículos ovarianos mais desenvolvidos e dos óvulos maduros.

Os sinais clínicos iniciais em frangos de corte incluem corrimento nasal, tosse ou espirros dis-

cretos, tumefação periocular e redução de apetite. O quadro evolui para um hiperemia da conjuntiva, com edema da glândula lacrimal. Após 12 a 24 horas, as aves apresentam um edema subcutâneo na cabeça, que se inicia ao redor dos olhos, aumentando sobre toda a cabeça e descendo para o tecido submandibular e nuca. Após 72 horas, os animais apresentam sinais neurológicos caracterizados por apatia, leve torcicolo e movimentos repentinos na cabeça. Esse quadro pode se agravar durante os dias subseqüentes, podendo ocorrer dificuldades motoras.

Em matrizes, os primeiros sinais são falhas respiratórias brandas, rinite e conjuntivite, seguidas por incoordenação motora, torcicolo e opistótono, edema facial uni e bilateral atingindo toda a cabeça. Durante os primeiros estádios da doença, as galinhas arranham a face com o pé, o que leva ao aparecimento de um prurido localizado.

A queda na produção de ovos também tem sido associada com a SHS. As aves mais susceptíveis são os perus jovens e matrizes pesadas, principalmente na primeira semana de produção. Do ponto de vista clínico, a doença pode se manifestar sob as formas aguda e subaguda, acometendo geralmente o trato respiratório superior, principalmente os cornetos nasais e traquéia. Na forma aguda inicial, as aves apresentam uma prostração profunda, aspecto comatoso ou estado de apatia (as aves ficam paradas durante 3 a 5 horas sem ingerir alimentos ou água), indo a óbito por inanição ou desidratação.

8.7.3 Imunidade

Tanto as infecções naturais como experimentais induzem a formação de anticorpos, detectáveis aproximadamente três semanas após a inoculação/infecção. Os anticorpos neutralizantes alcançam seu nível máximo em cinco a seis semanas pós-infecção. Anticorpos são detectados em várias categorias de animais, sem associação com doença clínica, reforçando a hipótese de que a maioria das infecções são subclínicas.

A exposição do trato respiratório a patógenos resulta na produção de anticorpos locais das classes IgA e IgG, que são responsáveis pela neutralização do agente. Os anticorpos podem ser

detectados a partir de cinco dias após o aparecimento dos sinais clínicos, pelo uso de técnicas como o ELISA, SN e a imunofluorescência indireta (IFI). Em infecção experimental de pintos livres de patógenos específicos (*specific pathogen free*, SPF) foi possível detectar anticorpos a partir do 15º dia pós-inoculação, e os níveis persistiram até quatro semanas. A ativação do sistema imune local e a produção de anticorpos circulantes são mecanismos importantes para a proteção após o desafio viral, mas a imunidade celular apresenta uma importância maior na defesa contra o APV.

8.7.4 Diagnóstico

O quadro clínico pode apresentar variações, dependendo das condições ambientais e das infecções secundárias, e não existem sinais patognômicos. Portanto, é necessário que seja realizado o diagnóstico laboratorial.

A confirmação da infecção pelo APV depende da demonstração do vírus ou antígenos virais; ou de anticorpos específicos no soro. Métodos sorológicos, como a SN, IFA e ELISA, são os métodos de escolha para diagnóstico da infecção.

Em geral, o vírus é mais dificilmente isolado de frangos do que de perus. Acredita-se que este fato possa se dar em razão do curto tempo de replicação do agente nos tecidos alvo, não estando mais presente por ocasião do aparecimento dos sinais clínicos. O isolamento viral raramente é bem-sucedido em aves com sinais clínicos severos, provavelmente devido a infecções secundárias. A replicação viral nos tecidos alvo também pode não estar no pico no momento da coleta.

O isolamento pode ser realizado em cultivos primários de embrião de galinha, em ovos embrionados, em cultivos de anel de traquéia (TOC) e em linhagens celulares (principalmente Vero e CER [*chicken embryo related*]). As células inoculadas apresentam efeito citopático (ECP) com formação de sincícios. Nos anéis de traquéia, é observada uma ciliostase (redução dos movimentos ciliares). O sucesso do isolamento viral depende da quantidade de partículas virais viáveis presentes na amostra enviada ao laboratório e da utilização de técnicas adequadas.

O uso da RT-PCR na detecção do APV em perus e galinhas apresenta como vantagem a ca-

pacidade de detectar pequenas quantidades de vírus, sem a necessidade de testes preliminares ou confirmatórios. Por ser altamente específica, a reação em cadeia da polimerase (PCR) não é afetada pela presença de outros patógenos. Essa técnica pode ser de suma importância para a caracterização molecular de isolados virais e em estudos epidemiológicos. As técnicas de RT-PCR, nested-PCR e PCR em tempo real apresentam uma sensibilidade pelo menos 100 vezes maior do que o isolamento viral.

O material para o diagnóstico (traquéia, pulmão, cabeça e ou *swab* naso-traqueal) deve ser enviado refrigerado, o mais rápido possível para o laboratório, não sendo necessário o pré-congelamento.

8.7.5 Controle e profilaxia

As boas práticas de manejo e biossegurança são fundamentais para o controle de surtos causados pelo APV, especialmente em perus. Fatores, como: o sistema de criação, idade das aves, infecções bacterianas ou virais secundárias, má ventilação, contaminação ambiental, poeira, alta densidade populacional e oscilações de temperatura, devem ser observados para o controle e prevenção dessas enfermidades.

Uma boa ventilação e troca de cama favorecem a redução dos níveis de amônia. A amônia pode contribuir para a replicação rápida do vírus, pois pode propiciar injúria no epitélio ciliar, facilitando a replicação e disseminação do vírus para outros tecidos.

As vacinas inicialmente foram desenvolvidas para uso em perus, mas também provaram ser úteis no controle da infecção pelo APV em galinhas. Os programas de vacinação têm sido rotineiramente utilizados em países onde o APV está presente em criações de perus e galinhas. A prática de vacinação de aves comerciais tem auxiliado na redução das perdas econômicas por minimizar a doença clínica, mortalidade e as perdas por queda na postura.

Vacinas com o vírus atenuado ou inativado quimicamente têm sido utilizadas. Vacinas com o vírus vivo atenuado dos subtipos A e/ou B têm sido aplicadas em perus e em galinhas, isoladamente ou combinada com outras vacinas. A

recomendação de um programa de vacinação depende de cada empresa e da situação particular de cada granja. Entretanto, de modo geral, recomenda-se a primovacinação com vacinas vivas atenuadas, para estimular clones de células de memória, obtendo, assim, uma resposta mais efetiva. A revacinação deve ser realizada com uma vacina inativada. Embora a vacina não proteja completamente os animais, os sinais respiratórios serão mais brandos em caso de infecção.

8.8 Vírus da doença de Newcastle

A doença de Newcastle (ND) é uma importante doença de aves causada pelo paramixovírus aviário sorotipo 1 (APMV-1), também conhecido como vírus da doença de Newcastle (NDV). Pela sua importância sanitária estratégica, a ocorrência de um surto da ND pode resultar na interrupção da exportação regional ou nacional da carne de frango, causando grandes perdas econômicas para a região ou país afetado. Várias espécies de aves silvestres e domésticas podem servir de reservatórios do NDV e parecem se constituir em fontes dos diferentes tipos de vírus que, frequentemente, são encontrados nas outras espécies.

A ND é um dos principais problemas sanitários da avicultura industrial. É uma enfermidade viral aguda, altamente contagiosa, que acomete aves comerciais e outras espécies aviárias, produzindo sinais respiratórios frequentemente acompanhados de manifestações nervosas, diarreia e edema da cabeça. As manifestações clínicas e a mortalidade variam de acordo com a virulência da amostra viral envolvida.

8.8.1 O agente

O NDV pertence ao gênero *Avulavirus*, espécie paramixovírus aviário sorotipo 1 (APMV-1). No gênero *Avulavirus*, existem ainda outros oito sorotipos virais designados de 2 a 9. Os vírions do NDV são pleomórficos e, muitas vezes, esféricos, com o diâmetro de aproximadamente 180 nm. O NDV é inativado após três horas a 56°C ou 30 minutos a 60°C, e por ação de pH ácido. Os vírions são sensíveis ao éter e são inativados por

desinfetantes contendo formol e/ou fenol, porém podem sobreviver por longos períodos a temperatura ambiente, especialmente nas fezes.

A variação antigênica do NDV pode ser detectada pelos testes de HI. Uma das variações mais notáveis tem ocorrido no vírus responsável pela panzootia em pombos. Este vírus, citado como “pigeon APMV-1 (PPMV-1)”, é diferente do vírus padrão nos testes de HI, mas não difere substancialmente dos vírus utilizados nas vacinas convencionais não-protetoras. Nos últimos anos, as amplas variações antigênicas e genéticas do vírus evidenciaram a grande dificuldade em compreender a epidemiologia da ND.

Os isolados do NDV são classificados de acordo com a sua patogenicidade. As amostras *velogênicas* apresentam alta virulência; as amostras *mesogênicas* possuem virulência moderada e as *lentogênicas* são pouco ou nada virulentas. Os métodos disponíveis para essa classificação permitem a distinção entre amostras com diferença acentuada no potencial patogênico, porém podem produzir resultados discrepantes com amostras de virulência semelhante. As amostras de NDV usadas em vacinas atenuadas são lentogênicas e apresentam variações individuais de virulência para o trato respiratório da galinha.

8.8.2 Histórico e epidemiologia

Os primeiros surtos da ND ocorreram em aves domésticas no ano de 1926, em Java, na Indonésia, e em Newcastle-upon-Tyne na Inglaterra (1927). Entretanto, relatos mais antigos indicam que esta doença já ocorria na Europa pelo menos desde 1912. No Brasil, a primeira descrição da doença foi realizada em 1953, quando foi realizado o isolamento da amostra M33 na cidade de Macapá, Amapá. A origem do surto foi provavelmente a importação de carcaças congeladas de frango dos Estados Unidos. A partir desta data, a doença passou a ser relatada em todo o território nacional, ocasionando graves perdas econômicas para a avicultura do país.

Desde 2002, o Ministério da Agricultura e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vêm realizando inquéritos epidemiológicos sistemáticos em aves silvestres e migratórias, nos

quais foram isoladas amostras altamente patogênicas do NDV nas regiões Norte, Nordeste e Sul. No pantanal mato-grossense, foram isoladas amostras patogênicas de NDV de diferentes aves silvestres, muitas delas vivendo em estrito contato com aves domésticas e comerciais.

Após cinco anos sem registros de focos, o Brasil voltou a registrar surtos da ND em criações comerciais, em 2006, no Rio Grande do Sul. A eventual ocorrência da doença no país acarreta a imediata suspensão das exportações de produtos avícolas, com graves prejuízos para a avicultura nacional. No Brasil, a ND é controlada pela vacinação, mas existem áreas declaradas livres, nas quais a vacinação não é mais praticada. Surtos da ND são notificados esporadicamente no Brasil, principalmente em criações domésticas de fundo de quintal ou em galinhas criadas de forma semi-intensiva e não comercial.

A ND é endêmica em muitos países, mas é muito difícil de se avaliar a sua real prevalência no mundo. Em alguns países onde a doença ocorre, não há dados sobre a sua distribuição e abrangência, nem se ocorre somente em criações domésticas ou também em criações comerciais. Mesmo em aves com finalidade comercial, a estimativa da distribuição geográfica do NDV torna-se confusa devido ao uso de vacinas vivas, contendo cepas virais consideradas virulentas em outros países. Mesmo em países livres da doença por muito tempo, o monitoramento sistemático ocasionalmente revela infecções com sinais leves, provocadas por amostras não-virulentas, propagadas presumivelmente por aves silvestres. A forma altamente patogênica da ND representa um problema sério para a avicultura comercial, tanto por ser considerada uma doença enzoótica em vários países, quanto por ser a causa de epizootias frequentes na África, Ásia, América Central e em regiões da América do Sul. Na Europa, a ocorrência da doença parece ser esporádica, a despeito dos programas de vacinação.

Aves domésticas e silvestres são susceptíveis ao NDV, as galinhas (*Gallus gallus*) estão entre as mais susceptíveis e as aves aquáticas estão entre as menos suscetíveis. O NDV já foi isolado em mais de 241 espécies, abrangendo 27 das 50 ordens de aves existentes. Algumas espécies

(psitacídeos e aves selvagens) parecem possuir o potencial de portadoras, podendo excretar cepas virulentas do NDV. Os mamíferos podem atuar como vetores mecânicos do vírus. Além de poder carrear mecanicamente o agente, o homem pode apresentar a doença sob a forma de conjuntivite branda.

A principal via de transmissão do vírus é por contato direto ou indireto, por aerossóis ou por transmissão aérea; por pessoas, equipamentos, água e vacinas contaminadas. O vírus é excretado durante a fase de incubação, na fase clínica e na convalescença da doença e está presente no ar expirado, nas secreções respiratórias, nas fezes, nos ovos e em vários tecidos das aves doentes.

8.8.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A patogenia da infecção pelo NDV pode ser dividida de acordo com a virulência da amostra viral envolvida e com os sinais clínicos. Os vírus patogênicos produzem a forma *lentogênica*, que se caracteriza por infecção subclínica ou sinais respiratórios moderados; a forma *mesogênica* apresenta sinais respiratórios e ocasionalmente neurológicos; e a forma *velogênica* é a forma mais severa e está associada com mortalidade elevada. Esta forma é dividida em *neurotrópica* (sinais respiratórios e neurológicos) e *viscerotrópica* (lesões hemorrágicas no intestino). Portanto, as cepas do NDV que são realmente importantes do ponto de vista clínico-patológico e epidemiológico são as velogênicas viscerotrópicas e/ou neurotrópicas. A patogenia desse vírus está associada com o seu tropismo pelos diferentes tecidos do hospedeiro e com a virulência da cepa.

A base molecular da virulência do NDV é determinada principalmente pela sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da glicoproteína F, e pela presença de proteases celulares necessárias para a ativação do precursor (F0) desta proteína. A proteína F é sintetizada como uma precursora (F0), que é clivada em F1 e F2 por proteases celulares. Essa clivagem é necessária para a infectividade dos vírions e ocorre com mais eficiência em moléculas de F0 que possuem vários aminoácidos básicos no sítio de clivagem. Cepas

virais contendo esta característica podem ter a sua F0 clivada em uma variedade de tecidos e, por isso, são mais virulentas. Ao contrário, nos vírus lentogênicos, a clivagem ocorre somente com a protease reconhecendo uma simples arginina (protease do tipo tripsina). Por isso os vírus lentogênicos estão restritos a determinados tecidos do hospedeiro, nos quais enzimas tipo tripsina estão presentes, como no trato digestivo e respiratório. Já, os vírus patogênicos, podem replicar em uma variedade de tecidos e órgãos, resultando em infecção sistêmica.

Os sinais clínicos observados na ND não são patognômicos, e a infecção pode variar de subclínica até doença com mortalidade de 100%. Em termos gerais, a doença é caracterizada por depressão, anorexia, diarreia, prostração, edema de cabeça e barbelas; sinais neurológicos como paralisia, tremores, torcicolo e opistótono; além de sinais respiratórios como tosse e espirros. Aves de postura podem apresentar redução da produção de ovos.

Os variantes virulentos do NDV podem replicar em aves vacinadas, mas os sinais clínicos são bastante reduzidos, de acordo com o nível de anticorpos presentes.

Da mesma forma, nenhuma lesão macro ou microscópica pode ser considerada patognômica para todas as formas da ND. As carcaças de aves que morrem em consequência da doença por cepas virulentas estão geralmente desidratadas, e as lesões macroscópicas variam com o vírus. Os vírus virulentos panzooticos da ND produzem lesões hemorrágicas no trato intestinal. Alguns autores têm relatado lesões no pró-ventrículo, enquanto outros relatam um envolvimento mais proeminente do duodeno, jejuno e íleo.

Em casos de envolvimento respiratório, as lesões estão geralmente presentes no trato respiratório e os achados incluem congestão e lesões hemorrágicas, além de aerossaculite. As lesões inflamatórias mais frequentes na traquéia incluem tumefação da mucosa, hiperemia, edema e infiltrado de linfócitos; e a sua intensidade está associada com a virulência das amostras. As lesões microscópicas não têm significado diagnóstico. Na maioria dos tecidos e órgãos afetados, observam-se: hiperemia, necrose, infiltrado celular e

edema. Lesões macroscópicas no sistema nervoso central são pouco frequentes mesmo em aves que desenvolvem sinais neurológicos. Quando ocorrem, essas alterações são de uma encefalomielite não-purulenta.

Surtos com amostras velogênicas viscerotrópicas iniciam com apatia, sinais respiratórios e debilidade, finalizando com prostração e morte. Edema na cabeça e ao redor dos olhos podem ser observados, e a mortalidade pode atingir 100% em aves não-vacinadas. Aves acometidas por vírus velogênicos neutrotrópicos apresentam doença respiratória severa acompanhada de sinais neurológicos. Dessa forma, a infecção pelo NDV em aves domésticas varia desde inaparente até formas mais severas, sendo as últimas caracterizadas por sinais respiratórios, digestivos e neurológicos. A produção de ovos reduz-se drasticamente em aves adultas, podendo estender-se por semanas. A morbidade pode chegar a 100%, mas a mortalidade atinge até 50% em aves adultas e até 90% em aves jovens. Amostras de patogenicidade média geralmente causam doença respiratória, com rara ocorrência de envolvimento neurológico. Nesses casos, a mortalidade é geralmente baixa, exceto em aves muito susceptíveis ou com infecções concomitantes.

8.8.4 Diagnóstico

O caráter estratégico do NDV, determinado pela OIE, requer um diagnóstico rápido e conclusivo da enfermidade. Em casos suspeitos e visando reduzir o risco de disseminação e difusão do vírus, recomenda-se a realização de necropsia por um profissional no próprio local, com colheita e remessa de material para o laboratório oficial. O material a ser enviado deve incluir fezes, suabes traqueais ou cloacais e tecidos de animais necropsiados, devendo-se eleger aqueles com alterações aparentes. Esse material deve ser conservado refrigerado se o processamento for realizado dentro de 48 horas, ou congelado se a realização dos testes for demorar mais.

O diagnóstico definitivo da infecção é obtido pelo isolamento e identificação do vírus em ovos embrionados a partir de suabes traqueais ou cloacais, ou de macerados de órgãos. Ovos SPF com

embriões de nove dias são inoculados com 0,1 mL da suspensão na cavidade alantóide e, após cinco a sete dias, o líquido é colhido e testado pela técnica de HA com eritrócitos de galinha. O agente hemaglutinante detectado é, então, identificado por HI com anti-soro específico, que ainda permite diferenciá-lo da influenza aviária. Esse método demonstra a presença do agente, mas não indica se o vírus é patogênico ou não.

O diagnóstico completo da doença requer a determinação da virulência do vírus, que pode ser obtida pelo seqüenciamento de genes ou por testes *in vivo*. Dentre os testes *in vivo*, recomenda-se o que determina o índice de patogenicidade intracerebral (IPIC). Este teste se baseia na inoculação do líquido alantóide fresco no cérebro de 10 pintinhos SPF de um dia. Cada ave é examinada a intervalos de 24 horas, durante oito dias, e classificada em diferentes graus: zero (se normal), 1 (se doente) e 2 (se morta). Os vírus mais virulentos chegam à CPI máxima de 2,0, enquanto os vírus lentogênicos resultam em valores próximos a zero.

Além do isolamento em ovo embrionado, o diagnóstico da infecção pelo NDV pode ser realizado por RT-PCR a partir de RNA extraído das amostras clínicas enviadas para o laboratório.

Várias viroses aviárias devem ser consideradas no diagnóstico diferencial: como cólera, influenza, metaneumovírus, vírus da bronquite infecciosa; vírus da laringotraqueíte aviária, entre outras. Doenças de origem bacteriana a serem consideradas incluem a micoplasmose, psitacose, pasteurelose, entre outras.

8.8.5 Controle e profilaxia

A avicultura industrial investe considerável esforço na prevenção da ND pelo uso sistemático de vacinas, biossegurança e aplicação de legislação específica. Apesar disso, a doença continua se constituindo em uma ameaça concreta para a avicultura, pois várias espécies animais não-vacinadas podem servir de reservatórios para o agente. Por isso, é necessário um monitoramento sistemático e contínuo para avaliar a condição sanitária dos plantéis avícolas. Esse tipo de monitoramento tem permitido que a ND, além de

outras doenças, seja prontamente identificada e controlada.

A vacinação contra a ND protege as aves das consequências clínicas da doença, mas não impede a replicação e excreção viral. Dessa forma, o controle efetivo da infecção deve incluir também boas práticas de manejo e medidas de biossegurança.

A ocorrência de focos da doença exige o isolamento completo das propriedades afetadas, limpeza e desinfecção das instalações, controle de tráfego humano, entre outras medidas.

Atualmente, as empresas brasileiras, na maioria das regiões, utilizam a vacinação sistêmica contra a ND. Os esquemas de vacinação utilizados em reprodutoras e em aves de postura são variados e dependem de cada empresa. Geralmente são aplicadas vacinas atenuadas na recria, seguido de uma revacinação com uma vacina inativada algumas semanas antes da transferência para a produção. Algumas empresas ainda realizam um reforço com vacinas atenuadas durante a fase de produção (40^a, 50^a e 60^a semanas). Em relação à vacinação em frangos de corte, não existe um consenso entre as empresas avícolas.

As amostras lentogênicas utilizadas na formulação vacinal no Brasil são a La Sota (LS), Ulster (UL) e VG-GA (VG). As amostras vacinais são preparadas em ovos embrionados de galinhas SPF. A aplicação das vacinas atenuadas pode ser feita por instilação nasal ou ocular, com o auxílio de um conta-gotas, ou pela via oral através da água de bebida. Pintos de sete a 10 dias de idade recebem 100 µL em uma das narinas ou no olho; ou duas gotas, uma em cada narina ou olho. Como medida de reforço, recomenda-se revacinar as aves periodicamente, com intervalos de três a quatro meses. A vacina produz imunidade somente após 21 dias, e a duração da imunidade varia de acordo com a idade das aves e o número de vacinações.

9 Bibliografia consultada

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. In: SAIF, Y.M. et al. **Disease of Poultry**. 11.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003. p.63-95.

- ALEXANDER, D.J.; BELL, J.G.; ALDERS, R.G. A technology review: Newcastle disease. Rome: FAO Animal Production and Health Papers - 161, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 26 fev. 2007.
- ALEXANDER, D.J.; MANVELL, R.J.; PARSONS, G. Newcastle disease virus (strain Herts 33/56) in tissues and organs of chickens infected experimentally. *Avian Pathology*, v.35, p.99-101, 2006.
- ALMEIDA, R.S. et al. Bovine respiratory syncytial virus subgroup B is circulating in Brazil. *The Veterinary Record*, v.158, p.632-634, 2006.
- APPEL, M.G.J.; SUMMERS, B.A. Canine distemper: current status. In: CARMICHAEL, L.E. (Ed). Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 16 out. 2006.
- ARNS C.W. et al. Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.36, p.541, 2003.
- ARNS, C.W.; HAFEZ, H.M. Swollen head syndrome in poultry flocks in Brazil. *Proceedings of the 41st Western Poultry Diseases Conference*, v.41, p.81-84, 1992.
- BAUMGÄRTNER, W.; KRAKOWKA, S.; GORHAMB, J.R. Canine parainfluenza virus-induced encephalitis in ferrets. *Journal of Comparative Pathology*, v.100, p. 67-76, 1989.
- BAYON-AUBOYER, M.H. et al. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (PVA) reveal a novel PVA subgroup. *The Journal of General Virology*, v.8, p. 2723-2733, 2000.
- BÖHM, M. et al. Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. *The Veterinary Record*, v.154, p.457-463, 2004.
- BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Portaria 182 de 8 de novembro de 1994. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 12 fev. 2007.
- CARBREY E.A. et al. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine diarrhea virus and shipping fever (Parainfluenza 3). *Proceedings of the United States Animal Health Association*, v.75, p.629-648, 1971.
- CARTER, G.R.; WISE, D.J.; FLORES, E.F. Paramyxoviridae. In: _____. (Eds). **A concise review of veterinary virology**. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 05 out. 2006.
- COLLINS, M.S.; BASHIRUDDIN, J.B.; ALEXANDER, D.J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of Virology*, v.128, p.363-370, 1993.
- COLLINS, M.S.; McINTOSH, K.; CHANOCK, R.M. Respiratory syncytial virus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. Cap.44, p.1313-1351.
- COOK, J.K.; CAVANAGH, D. Detection and differentiation of avian pneumovirus (metapneumoviruses). *Avian Pathology*, v.31, p.117-132, 2002.
- COSWIG, L.T. **Presença de anticorpos contra Pneumovírus aviário nas regiões Sul e Sudeste do Brasil**. 1998. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998.
- CUNHA, R.G.; SILVA, R.A. Isolamento e identificação do vírus da Doença de Newcastle no Brasil. *Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, v.23, p.17-33, 1955.
- D'ARCE, R.C. et al. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, v.334, p.133-136, 2005.
- DANI, M.A.; DURIGON, E.L.; ARNS, C.W. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. *Journal of Virological Methods*, v.79, p.237-41, 1999.
- DRIEMEIER, D. et al. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, p.77-81, 1997.
- FLORES, E.F. et al. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.20, p.139-143, 2000.
- GONÇALVES, D.A. et al. Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.33, p.953-956, 2003.
- GONÇALVES, I.P.D. et al. Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, v.23, p.389-390, 1993.
- HENRICKSON, K.J. Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, p.242-264, 2003.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary Microbiology**. Malden, MA: Blackwell Science, 1999. 479p.
- INABA, Y. et al. Isolation of bovine respiratory syncytial virus. *The Japanese Journal of Experimental Medicine*, v.40, p.473-474, 1970.
- JUHASZ, K.; EASTON, A.J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence

for two distinct subgroups. **The Journal of General Virology**, v.75, p.2873-2880, 1994.

KOMMERS, G.D. et al. Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle disease viruses isolated from chickens, wild, and exotic birds. **Avian Disease**, v.47, p.319-329, 2003.

KOMMERS, G.D. et al. Virulence of pigeon-origin isolates of Newcastle disease for domestic chickens. **Avian Disease**, v.45, p.906-921, 2001.

LARSEN, L.E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.41, p.1-24, 2000.

MCGAVIN, M.; CARLTON, W.; ZACHARY, J. **Thomson's Special Veterinary Pathology**. 3.ed. New York: Mosby, 2001. 768p.

MUNIR S.; KAPUR V. Regulation of the host cell transcriptional physiology by the avian pneumovirus provides key insights into host pathogen interations. **Journal of Virology**, v.77, p.4899-4910, 2003.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.

OIE. Newcastle disease. In: _____. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2004. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm. Acesso em: 15 mar. 2007.

PACCAUD, M.F.; JACQUIER, C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Archiv fur die Gesamte Virusforschung**, v.30, p.327-342, 1970.

QUAN S.F. et al. Canine parainfluenza type 2 and Bordetella bronchiseptica infection produces increased bronchoalveolar lavage thromboxane concentrations in beagle puppies. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.44, p.171-175, 1991.

RANDHAWA, J.S. et al. Rescue of synthetic minireplications establishes the absence of NS1 e NS2 from avian pneumoviruses. **Journal of Virology**, v.71, p.9849-54, 1997.

REISINGER, R.C.; HEDDLESTON, K.L.; MANTHEI, C.A. A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.135, p.147-152, 1959.

SCHRIJVER, R.S. Immunobiology of bovine respiratory syncytial virus infections. **Tijdschrift voon Diergeneeskunde**, v.123, p.658-662, 1998.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**, v.109, p.56-68, 2005.

1 Introdução	691
2 Classificação e taxonomia	691
3 Estrutura do vírion e do genoma	692
4 O ciclo replicativo	693
5 Rabdovírus de interesse veterinário	695
5.1 Vírus da estomatite vesicular	695
5.1.1 Epidemiologia	696
5.1.2 Patogenia e sinais clínicos	699
5.1.3 Imunidade	699
5.1.4 Diagnóstico	700
5.1.5 Controle e profilaxia	700
5.2 Vírus da raiva e lissavírus relacionados	700
5.2.1 O agente	701
5.2.2 Estrutura do vírion	702
5.2.3 Replicação viral	703
5.2.4 Variações antigênicas	704
5.2.5 Epidemiologia	705
5.2.6 Patogenia, sinais clínicos e patologia	708
5.2.7 Diagnóstico	709
5.2.8 Prevenção e controle	711
5.2.9 Tratamento	711
5.3 Rabdovírus de peixes	713
5.3.1 Histórico e classificação	713
5.3.2 Epidemiologia	714
5.3.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia	715
5.3.4 Imunidade	716
5.3.5 Diagnóstico	717
5.3.6 Controle e profilaxia	717
6 Bibliografia consultada	718

¹ Seção geral da família e VSV (LLR); raiva (PMR e HB); rabdovírus de peixes (GK). Tradução da parte geral, VSV e rabdovírus de peixes: Renata Dezengrini.

1 Introdução

A família *Rhabdoviridae* (ordem *Mononegavirales*) abriga vírus que infectam uma grande variedade de espécies, incluindo artrópodes, plantas e vertebrados. Dentre os vírus de vertebrados, existem rabdovírus que infectam mamíferos, aves e peixes. A família possui alguns vírus de grande importância para a saúde humana e animal. O vírus da raiva (RabV) causa uma das doenças mais temidas e fatais de todos os tempos, e o vírus da estomatite vesicular (VSV) está associado com surtos de repercussão econômica importante em eqüinos e em animais de produção. Os primeiros relatos da raiva ocorreram há mais de 2.700 anos, quando já era descrita como uma doença grave, caracterizada por hipersalivação, alterações no comportamento e morte inevitável. A raiva tem também um impacto importante em medicina veterinária, tanto pela sua ocorrência urbana em cães, como pela sua ocorrência em espécies silvestres, como o mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), esquilos, canídeos silvestres, morcegos, mangostas (*Cynictis penicillata*), os quais representam um risco iminente de infecção para humanos. Os morcegos hematófagos, como o *Desmodus rotundus*, também carregam o vírus da raiva, podendo transmiti-lo a animais domésticos e, ocasionalmente, para humanos. Em certas regiões, é relativamente freqüente a ocorrência de casos esporádicos ou de surtos de proporções variáveis em animais de criação, principalmente em bovinos. Outra doença relevante em medicina veterinária é a estomatite vesicular (VS), que afeta os bovinos, suínos e eqüinos. Em bovinos e suínos, a VS apresenta características clínicas muito semelhantes à febre aftosa (FMD). Portanto, os surtos de VS resultam em significativas perdas econômicas conseqüentes da interdição e quarentena, até que se proceda ao diagnóstico diferencial para descartar a FMD.

Devido à sua ampla distribuição na natureza e à capacidade de infectar várias espécies de mamíferos, peixes e plantas, existem muitos rabdovírus com potencial patogênico ainda desconhecido. Alguns rabdovírus têm sido identificados como patógenos emergentes em humanos e

animais, como o *Australian bat lyssavirus* e o vírus Chandipura, um vírus reemergente causador de encefalite em crianças na Índia. Outros rabdovírus provavelmente serão descobertos no futuro, adicionando-se, assim, mais patógenos nesta importante família viral.

Este capítulo abordará as características gerais da família *Rhabdoviridae*, a sua taxonomia, estrutura e organização genômica e estratégia de replicação. Além disso, serão abordadas com mais detalhes as doenças por rabdovírus mais relevantes para a medicina veterinária: a raiva, a estomatite vesicular e as produzidas por rabdovírus de peixes.

2 Classificação e taxonomia

Os rabdovírus são classificados em seis gêneros e dois deles contêm apenas vírus de plantas (Tabela 27.1). Como os outros membros da ordem *Mononegavirales*, os rabdovírus possuem como genoma uma molécula de RNA linear de sentido negativo, que possui pelo menos cinco genes,

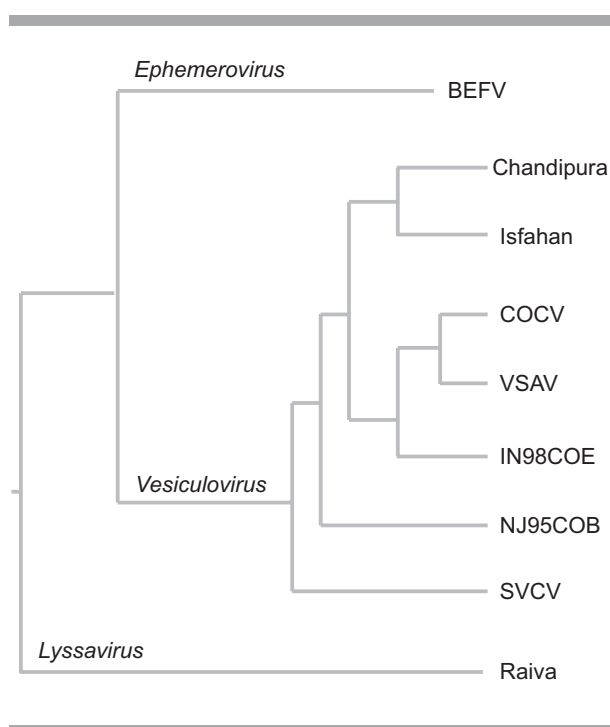


Tabela 27.1. Classificação taxonômica dos membros da família *Rhabdoviridae*, com espécies hospedeiras e doenças de importância veterinária.

Gênero	Espécie/tipo	Hospedeiro(s)	Doença de importância veterinária
<i>Vesiculovirus</i>	Vírus da estomatite vesicular (VSV)	Mamíferos, peixes, insetos	Estomatite vesicular, viremia primaveril das carpas etc.
<i>Lyssavirus</i>	Vírus da raiva (RabV)	Mamíferos, insetos	Raiva, lissavírus dos morcegos australianos.
<i>Ephemerovirus</i>	Vírus da febre efêmera dos bovinos (BEFV)	Mamíferos, insetos	Febre efêmera de bovinos, doença do rio Adelaide.
<i>Novirhabdovirus</i>	Vírus da necrose hematopoiética (IHNV)	Peixes	Necrose hematopoiética, septicemia hemorrágica.
<i>Cytorhabdovirus</i>	Vírus da necrose amarela da alface	Plantas	Nenhuma.
<i>Nucleorhabdovirus</i>	Vírus do tomate anão	Plantas	Nenhuma.

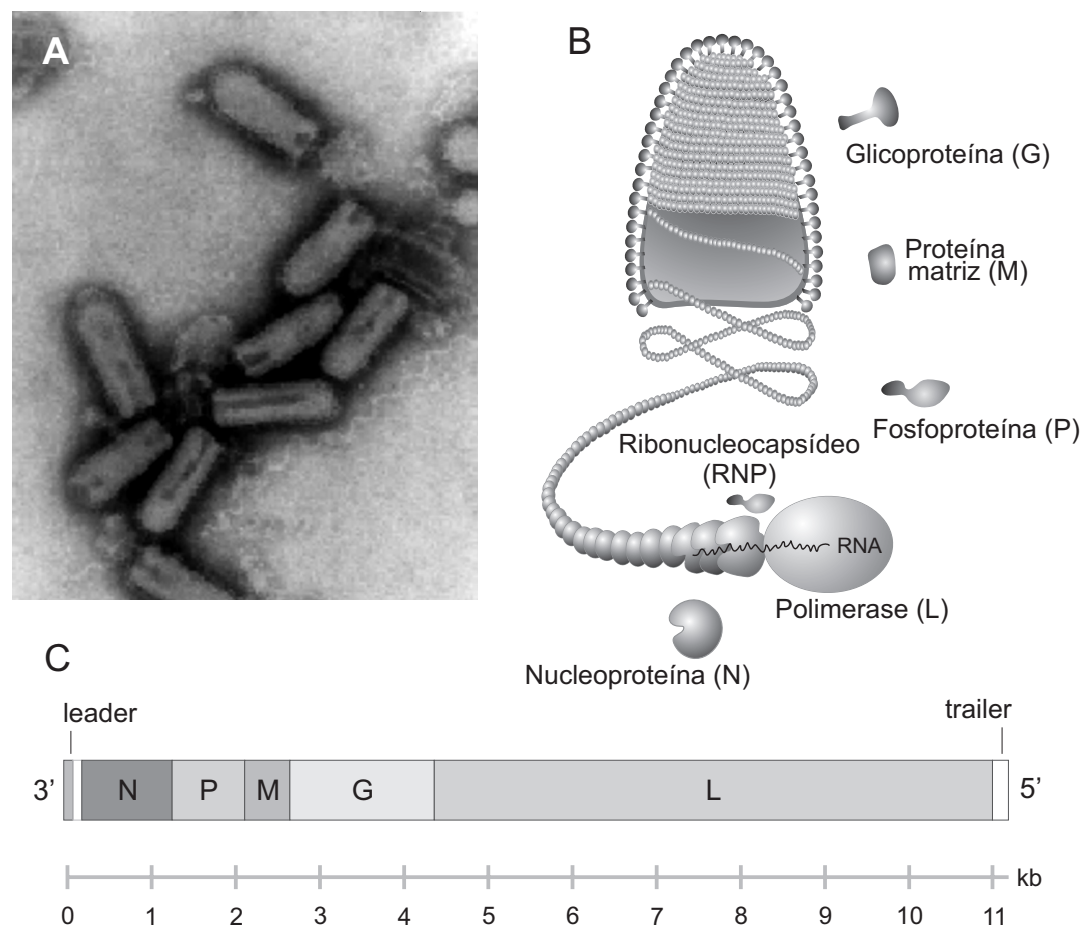
na ordem 3'-N-P-M-G-L-5'. Cada gene é flanqueado por seqüências conservadas de iniciação e terminação da transcrição, compostas de aproximadamente 10 nucleotídeos (nt). A organização genômica, a estrutura e morfologia dos vírions, juntamente com a estratégia de replicação e as relações sorológicas se constituem nas bases para a sua classificação. A Figura 27.1 apresenta a relação filogenética entre os vírus dos três gêneros que infectam mamíferos. A Tabela 27.1 apresenta a classificação taxonômica resumida da família.

3 Estrutura do vírion e do genoma

As partículas dos rabdovírus possuem um formato de bastão (do grego, *rhabdus* = bastão), com dimensões entre 100 e 430 nm de extensão por 40 a 100 nm de diâmetro (Figura 27.2A, B). Os vírions são compostos por uma estrutura helical interna (ribonucleoproteína, RNP), que contém o genoma. A proteína do nucleocapsídeo (N), a fosfoproteína (P) e a polimerase viral (L) envolvem o RNA genômico e constituem o ribonucleocapsídeo. A proteína da matriz (M) está associada intimamente com a RNP, constituindo-se na base estrutural que confere aos vírions o formato de

projétil. Uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira, contendo trimeros da glicoproteína de superfície (G), forma o envelope viral.

O genoma dos rabdovírus consiste de uma molécula de RNA de fita simples linear de polaridade negativa, com 11.000 a 15.000 nt (Figura 27.2C). A organização do genoma e a ordem dos genes são muito conservadas. O genoma possui uma pequena seqüência *leader* não-traduzida com 40 a 50 nt na extremidade 3', seguida por um sinal conservado de iniciação da transcrição; e pelos genes N, P, M, G e L. Esses genes são separados por regiões intergênicas conservadas. Próximo a extremidade 5' existe uma seqüência *trailer* de 40 a 50 nt, parcialmente complementar à região 3' *leader*. As regiões *leader*, *trailer* e as seqüências intergênicas possuem funções importantes na regulação da transcrição e replicação viral. Alguns rabdovírus possuem genes adicionais, como alguns vírus de plantas, que possuem um gene extra entre os genes P e M; e alguns rabdovírus de peixes possuem genes adicionais entre duas regiões do genoma, P-M e G-L. Alguns vesiculovírus e lissavírus codificam ainda algumas proteínas não-estruturais, pequenas e básicas, em uma segunda seqüência aberta de leitura (ORF) do gene da proteína P.



Fonte:- A) Dr David Sander, ICTVdB.

Figura 27.2. Estrutura dos vírions e do genoma dos membros da família *Rhabdoviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica do vírus da estomatite vesicular, VSV; B) Estrutura de uma partícula vírica e seus componentes; C) Estrutura e organização do genoma.

A infectividade dos rabdovírus é razoavelmente estável sob condições ambientais, especialmente sob pH alcalino. No entanto, os vírions são termolábeis e sensíveis à radiação solar e ultravioleta (UV). Na prática, o VSV pode ser facilmente inativado por desinfetantes baseados em detergentes.

4 O ciclo replicativo

O ciclo replicativo descrito a seguir baseia-se no vírus da estomatite vesicular (VSV), o protótipo da família. O ciclo inicia com a interação da glicoproteína G do envelope viral com recep-

tores na superfície celular (fosfatidil-serina, por exemplo). Essa interação resulta na adsorção e penetração dos vírions por endocitose (Figura 27.3). No interior da vesícula endocítica, sob pH ácido, a proteína G promove a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo. O complexo ribonucleoproteína (RNA+N+L+P) é liberado no citoplasma e a fita simples de RNA negativo é transcrita pelo complexo polimerase que está presente no vírion. As proteínas do nucleocapsídeo devem estar intimamente associadas com o RNA para que ocorra a transcrição e a replicação. O complexo polimerase ativo requer a associação de três unidades da fosfoproteína (P) com uma unidade da proteína L (*large*).

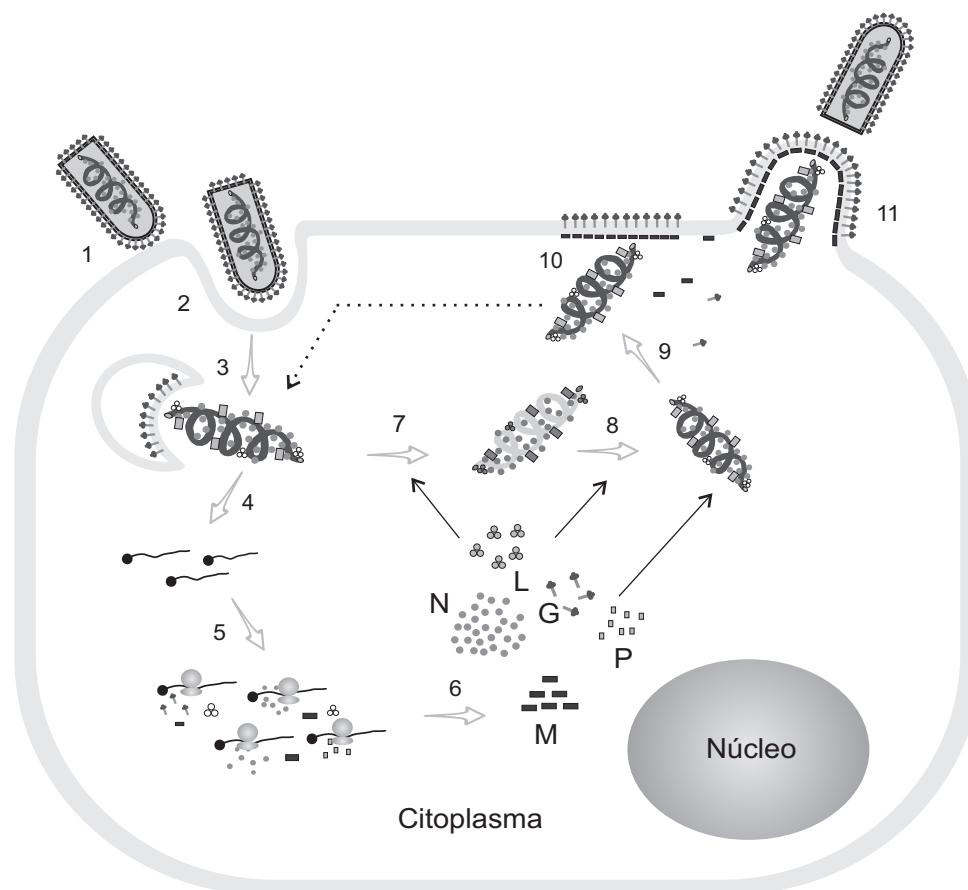


Figura 27.3. Ilustração esquemática do ciclo replicativo do vírus da estomatite vesicular (VSV), protótipo da família *Rhabdoviridae*. Após a ligação aos receptores específicos (1), os vírions são internalizados por endocitose (2), que é seguida de fusão do envelope com a membrana endossomal, sob pH baixo, e da liberação do nucleocapsídeo no citosol (3). Segue-se a transcrição individual dos genes (4) e tradução (5), resultando na produção das proteínas virais N, P, M, G e L (6). A polimerase viral (L), com a participação da proteína P, realiza a síntese da molécula de RNA complementar (7) e, a seguir, a síntese de cópias genômicas (8), que permanecem associadas com as proteínas que compõem a ribonucleoproteína (RNP). Os nucleocapsídeos (RNA+proteínas) recém-formados são transportados até a membrana plasmática (9), onde interagem com a proteína M e com as caudas da glicoproteína G (10), resultando no brotamento e egresso da progênie viral (11).

A transcrição do genoma dos rabdovírus é regulada por um mecanismo simples e eficiente, em que o nível de expressão de cada gene é determinado pela sua distância em relação ao promotor único, localizado próximo à extremidade 3'. Esse mecanismo é denominado de atenuação da transcrição, e o gradiente de produção de transcritos será na ordem $N > P > M > G > L$. Portanto, a proteína do nucleocapsídeo (N) é a proteína mais abundante e a polimerase (L) é a menos abundante. Cada RNA mensageiro (mRNA) é monocistônico (codifica apenas uma proteína) e possui uma estrutura *cap* na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. O gene P de alguns vírus é

uma exceção, pois codifica duas proteínas básicas pequenas em uma segunda ORF (Figura 27.3). Sequências conservadas das regiões intergênicas contêm sinais para a terminação da transcrição, adição de *cap* e poliadenilação. Uma sequência de 40 a 50 nt na extremidade 3' é transcrita, mas não recebe *cap* ou poli-A. Esse transcrito, denominado RNA *leader*, é produzido em grande quantidade e é transportado para o núcleo da célula, onde inibe a transcrição dos genes celulares.

O transcrito *leader* é seguido pelo mRNA da proteína N, que recebe o *cap* pelo complexo polimerase do vírion. Na extremidade final do gene N e de todos os cinco genes, encontra-se a seqüên-

cia 5'-AGUUUUUUCAUA -3', que sinaliza o final da transcrição e a poliadenilação do mRNA. A cauda poli-A é, provavelmente, sintetizada pela polimerase viral, que utiliza a sequência de sete bases Uracil como molde para iniciar a polimerização da sequência de Adeninas. A síntese dos quatro mRNA subsequentes ocorre de forma idêntica.

A tradução dos mRNA está associada com o processo de transcrição, e a quantidade de cada proteína reflete a abundância relativa de cada mRNA. Após a tradução das proteínas virais pelos ribossomos, o complexo polimerase realiza a transição do modo de transcrição para o modo de replicação do genoma, sintetizando cadeias completas do RNA com sentido positivo. Essas cópias de RNA conjugam-se com a proteína N e servem de molde para a síntese de cópias de RNA de sentido genômico.

Os mecanismos envolvidos na troca da transcrição para a replicação não estão completamente elucidados, mas a quantidade de proteína N parece desempenhar uma função importante. Após a síntese de cópias negativas do RNA, essas podem servir para transcrição e replicação ou podem, ainda, ser encapsidadas nas partículas virais, pela interação da proteína N com a proteína da matriz (M). O brotamento na membrana plasmática é mediado pela interação da M com a glicoproteína G (gG). A gG é sintetizada no retículo endoplasmático, transportada pelo complexo de Golgi e inserida na membrana plasmática na forma de trímeros. Após a inserção, esses trímeros interagem com os ribonucleocapsídeos recém-formados para formar vírions maduros, que brotam da superfície celular adquirindo o envelope lipoprotéico. A Figura 3 apresenta de forma esquemática e simplificada o ciclo replicativo do VSV.

In vitro, o VSV replica em uma variedade de células primárias e de linhagem de várias espécies animais, incluindo invertebrados e vertebrados. A maioria das linhagens celulares de mamíferos suporta a replicação do VSV, mas a susceptibilidade varia amplamente entre diferentes linhagens.

Em geral, as células BHK-21 são utilizadas para se obter altos títulos virais, enquanto as célu-

las Vero são utilizadas para isolamento do vírus. Células de origem aviária, como células de embrião de galinha, também são susceptíveis e produzem altos títulos do VSV. Este vírus também replica em cultivos de células de peixes e répteis. Da mesma forma, o vírus é capaz de replicar em várias linhagens celulares derivadas de insetos, como do *Aedes aegypti*. Em geral, a replicação na maioria das células de insetos é não-citolítica, contrastando com a replicação rápida e altamente lítica observada em células de mamíferos.

5 Rabdovírus de interesse veterinário

Este capítulo descreve em maiores detalhes três grupos de rabdovírus que são relevantes para a saúde animal: o vírus da estomatite vesicular (VSV), o vírus da raiva e lissavírus relacionados, além dos rabdovírus que infectam peixes.

5.1 Vírus da estomatite vesicular

A estomatite vesicular (VS) é uma enfermidade caracterizada pelo desenvolvimento de lesões vesiculares na boca, língua, tetos e na banda coronária dos cascos de bovinos, eqüinos e suínos. O vírus da estomatite vesicular (VSV) encontra-se amplamente distribuído nas Américas. Em bovinos e suínos, a doença é clinicamente indistinguível da febre aftosa, uma das doenças animais de maior importância econômica. Por isso, os surtos de VS resultam em perdas vultosas, principalmente pelas quarentenas exigidas até que se realize o diagnóstico laboratorial e se descarte a febre aftosa.

As primeiras descrições de doença vesicular em eqüinos (provavelmente a VS) ocorreram no século XIX, no sudeste dos EUA e na América Central. Em 1862, foi relatada a ocorrência de uma doença vesicular e febril em eqüinos do exército americano durante a guerra civil. A primeira grande epizootia de VS, descrita em detalhes nos EUA, ocorreu em 1916, acometendo um grande número de eqüinos, mulas e bovinos. Epizootias de VS continuaram a ocorrer no Sudoeste dos EUA, com intervalos de aproximadamente 10 anos. Porém o agente etiológico foi descrito pela

primeira vez em Indiana, em 1926, recebendo o nome de vírus da estomatite vesicular de Indiana (VSIV). No ano seguinte, um agente sorologicamente relacionado ao VSIV foi isolado de bovinos em Nova Jersey, sendo denominado vírus da estomatite vesicular de Nova Jersey (VSNJV). Estudos subsequentes demonstraram que esses vírus são sorologicamente distintos, sendo, assim, classificados em sorotipos separados.

5.1.1 Epidemiologia

– Distribuição geográfica

O VSIV e o VSNJV são endêmicos do Norte e Oeste da América do Sul (Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), na América Central até o Sul do México, com surtos descritos nessas regiões praticamente a cada ano. A maioria dos surtos (80%) é causada pelo VSNJV, mas o VSIV circula nessas áreas e, ocasionalmente, os dois sorotipos podem ser encontrados simultaneamente. No Norte do México e Sul dos EUA, a ocorrência da VS é esporádica, com surtos descritos no sudoeste americano a intervalos de oito a 10 anos, com duração de um a dois anos. No Brasil, esses dois vírus não foram detectados, mas surtos de estomatite vesicular têm sido descritos e são causados por vírus relacionados sorologicamente ao VSIV. Esses vírus foram classificados como Indiana 2 (VSIV-2), com o protótipo vírus Cocal (COCV); e Indiana 3 (VSIV-3), que possui como protótipo a cepa Alagoas (VSAV). A maioria dos casos no Brasil é causada pelo VSIV-3, enquanto o VSIV-2 ocorre apenas esporadicamente, e mais ao Sul do País. O VSIV-2 tem sido descrito ocasionalmente na Argentina, onde o último surto foi relatado em 1986. A Figura 27.4 apresenta a relação filogenética entre diferentes isolados e tipos do VSV obtidos de diferentes localizações geográficas.

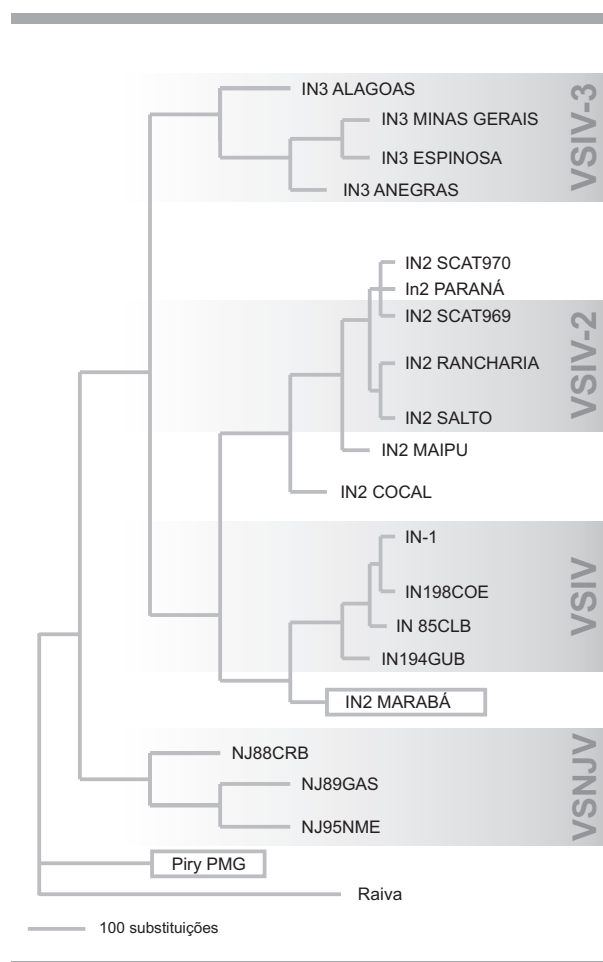


Figura 27.4. Relação filogenética entre diferentes isolados e tipos do VSV obtidos de diferentes locais nas Américas.

– Espectro de hospedeiros e ciclo natural

Como outros vesiculovírus, o VSV pode infectar várias espécies de hospedeiros, incluindo insetos, pássaros e mamíferos. Existem evidências sorológicas da infecção de mamíferos silvestres, como os ratos-de-algodão (*Sigmodon* spp), ratos-de-arroz (*Oryzomys* spp) e camundongos-de-campo (*Peromyscus* spp e *Reithrodontomys* spp); além de mamíferos como morcegos (várias espécies), macacos (*Alouatta palliata*); veados-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e suínos

selvagens (*Sus scrofa*). A infecção de animais silvestres parece ser assintomática, no entanto, lesões vesiculares pequenas têm sido descritas em suínos selvagens. Em contraste, animais domésticos, como os bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*), equídeos (cavalos, mulas e burros), suínos, ocasionalmente camelídeos (*Lama glama*), ovinos e caprinos infectados, freqüentemente apresentam sinais clínicos. A ocorrência de doença vesicular em equinos é um importante achado para a sua diferenciação de febre aftosa.

Existem evidências consistentes de que o VSV é um arbovírus, ou seja, que é transmitido por insetos. Várias espécies de insetos podem ser infectados pelos VSVs, e essa infecção tem sido detectada especialmente durante os surtos. Três espécies de insetos: as moscas-de-areia (*Lutzomyia* sp), as moscas-pretas (*Simulium* sp) e os pernilongos (*Culicoides* sp) são considerados vetores biológicos do vírus, pois são capazes de replicar e transmitir o VSV a espécies susceptíveis, tais

como: camundongos, suínos, bovinos e eqüinos. No entanto, ao contrário dos outros arbovírus, o VSV parece não produzir viremia em seus hospedeiros naturais (suínos, bovinos, cavalos, veados e suínos selvagens) após infecção experimental. Recentemente foi demonstrado que pode ocorrer transmissão do VSV entre moscas infectadas e não-infectadas ao se alimentarem em um mesmo animal não-virêmico. Esse mecanismo poderia explicar a transmissão do VSV durante os surtos, mesmo na ausência de hospedeiros mamíferos virêmicos. Uma ilustração simplificada da história natural do VSV com os prováveis hospedeiros naturais e acidentais está apresentada na Figura 27.5.

– Ocorrência em áreas endêmicas

Em áreas endêmicas, localizadas em regiões tropicais e subtropicais das Américas, os intervalos entre os surtos são inferiores a um ano.

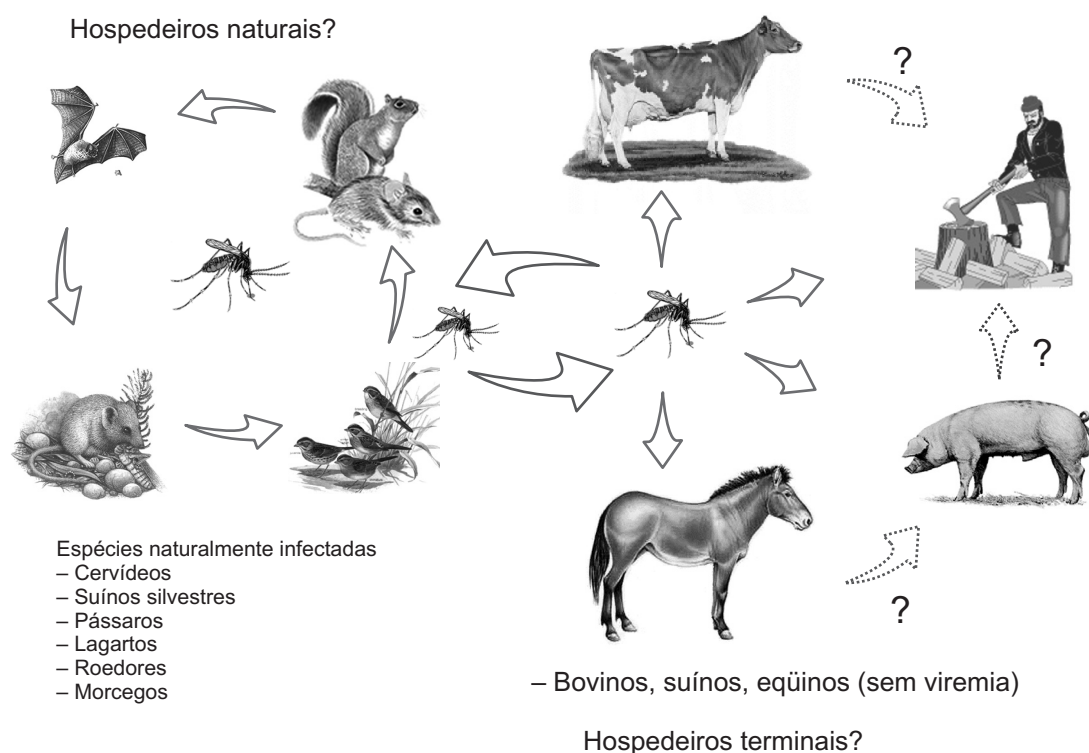


Figura 27.5. Provável ciclo natural do vírus da estomatite vesicular (VSV).

Vários estudos realizados em áreas endêmicas da Costa Rica demonstram que o pico dos sinais clínicos ocorre nas estações chuvosas ou secas, dependendo da zona ecológica. Os casos clínicos ocorreram com maior frequência em vacas em lactação, causados pelo VSNJV (90%) e pelo VSIV (10%). A maioria dos animais adultos, principalmente aqueles que desenvolveram a doença clínica, apresentou títulos altos de anticorpos neutralizantes contra o VSNJV (93%) e contra o VSIV (25%). Não foram detectadas evidências de mutações que alterassem o perfil antigênico da glicoproteína viral, embora alguns animais afetados possuíssem altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus homólogo previamente aos sinais clínicos.

Nessas áreas endêmicas, muitos animais tornam-se soropositivos durante os períodos de atividade viral sem manifestarem sinais clínicos da doença. Por isso, acredita-se que a circulação do vírus nessas áreas pode ocorrer na completa ausência de sinais clínicos nos animais de criação. Animais silvestres, como veados, primatas, suínos, morcegos e pássaros residentes nessas áreas, frequentemente possuem anticorpos neutralizantes contra o VSV, porém o papel desses animais no ciclo natural do vírus ainda não foi esclarecido.

Uma endemia da infecção pelo VSV ocorre na ilha inabitada de Ossabaw, na costa da Geórgia, USA. Nessa ilha não existem bovinos ou eqüinos, mas uma grande população de suínos silvestres, que possui anticorpos contra o VSV e que, ocasionalmente, apresenta lesões vesiculares típicas de VS. Estudos entomológicos demonstraram que moscas-da-areia que habitam essa área carregam o mesmo VSNJV que infecta os suínos silvestres. Além disso, a época de soroconversão desses animais ao vírus geralmente coincide com os picos populacionais desses insetos.

– Ocorrência em áreas não-endêmicas

Em áreas não-endêmicas, surtos da doença ocorrem em ciclos de um a dois anos com intervalos de oito a dez anos. A ocorrência não-endêmica da VS mais bem caracterizada acontece no

Oeste dos EUA, com grandes epizootias a cada 10 anos. Destacam-se as de 1916, 1925, 1937, 1945, 1956, 1965, 1972, 1982, 1995 e 2004, algumas dessas se estendendo por até dois anos. Os surtos típicos iniciam no Sudoeste dos EUA, nos estados do Texas, Arizona ou Novo México na primavera (abril a maio), progredindo na direção norte, seguindo rios e vales, atingindo estados do Noroeste, como Utah, Colorado, Wyoming, Nebraska e Montana no verão (agosto) e desaparecendo com as primeiras geadas (outubro a novembro). Esse padrão de ocorrência, aliado à presença do vírus em insetos hematófagos, como as moscas-pretas (*Simulium* sp) e pernilongos (*Culicoides* sp), sugere que as picadas de insetos são a principal forma de transmissão.

No entanto, em 1982, um surto de grandes proporções, no Oeste dos EUA, persistiu durante os meses de inverno até 1983. Esse surto foi associado com a movimentação de animais infectados para leilões, demonstrando a necessidade de estabelecimento de quarentenas em eventos futuros. A exemplo do restante das Américas, a maioria dos surtos nos EUA tem sido associada com o VSNJV. No entanto, o VSIV ressurgiu, em 1997, após 30 anos de aparente ausência.

– Epidemiologia molecular

Os surtos de VS em áreas endêmicas são estacionais e ocorrem virtualmente todos os anos. A análise filogenética dos vírus associados com esses eventos demonstrou que várias linhagens virais causam surtos simultaneamente, em diferentes regiões endêmicas. Ao contrário, as epizootias em áreas não-endêmicas são causadas geralmente por uma única linhagem viral, com pouca ou nenhuma variação genética ao longo do surto, e cada surto é, geralmente, causado por uma linhagem diferente. Esses padrões de ocorrência sugerem que os surtos em áreas não-endêmicas resultam da introdução de linhagens virais únicas a partir de áreas endêmicas, que se disseminam durante o surto e se tornam posteriormente extintas.

O VSV é muito variável e a sua diversidade genética pode ser observada entre os isolados de

campo em toda a sua distribuição geográfica. O gene mais conservado é o da proteína do nucleocapsídeo (N), enquanto o mais divergente é o da fosfoproteína (P), com 40 e 70% de divergência de nucleotídeos entre sorotipos, respectivamente. A evolução do VSV na natureza parece ser relacionada com a sua localização geográfica, pois diferentes grupos genéticos do vírus estão associados com diferentes regiões. Existem evidências de que fatores ecológicos presentes nesses locais influenciam a evolução do vírus. Em áreas endêmicas, algumas linhagens do VSV parecem ser mantidas por longos períodos de tempo em zonas ecológicas específicas. Apesar da presença de altos títulos de anticorpos neutralizantes nas populações que vivem em áreas endêmicas, alterações antigênicas relevantes (*antigenic drift*) não têm sido relatadas para o VSV.

5.1.2 Patogenia e sinais clínicos

Em animais de criação, a maioria das infecções naturais pelo VSV parecem ser assintomáticas, pois grande parte dos animais apresenta soroconversão sem manifestar sinais de doença. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o estado fisiológico (ex. gestação, lactação, idade) pode influenciar o desenvolvimento de sinais clínicos. Nesse caso, os fatores do hospedeiro provavelmente determinariam as consequências clínicas da infecção. A transmissão pela picada de insetos parece resultar em doença mais grave quando comparada com a transmissão iatrogênica. As glândulas salivares dos insetos contêm substâncias que regulam negativamente a resposta imune do hospedeiro, principalmente a resposta inata. Além disso, extratos de glândulas salivares de insetos potencializam a multiplicação viral em cultivos celulares e em camundongos inoculados.

A VS em bovinos, eqüinos e suínos é caracterizada por lesões vesiculares na boca (língua, lábios, gengivas), nos tetos e epitélio da banda coronária dos cascos, que surgem dois a quatro dias após a inoculação do vírus. Os bovinos e eqüinos raramente apresentam lesões em mais de um local, enquanto os suínos frequentemente desenvolvem vesículas em vários sítios. Depres-

são, febre, laminite e salivação excessiva são frequentemente observadas antes da formação das vesículas. Em vacas leiteiras, a produção de leite pode reduzir significativamente ou até mesmo cessar. Em gado de corte com lesões graves na boca, a perda de peso pode atingir 140 quilos. A mastite é uma consequência comum da infecção, devido à retenção de leite (pela dor durante a ordenha) e por infecção bacteriana secundária. Na maioria dos casos, há remissão das lesões dentro de sete a dez dias.

Durante um surto ocorrido no estado do Colorado, EUA, em 1982, foram estudados 13 rebanhos leiteiros, nos quais foram afetados 378 de um total de 2.400 animais. As lesões foram assim distribuídas: somente lesões orais (263 animais ou 69,3%); lesões somente nos tetos (87 animais ou 23%); lesões orais e nos tetos (22 animais ou 5,8%) e lesões apenas nos cascos (7 animais; 1,9%).

Em humanos, a infecção pelo VSV é semelhante à gripe, com um período de incubação de 24 a 48 horas. Na maioria dos casos, há letargia, mialgia, cefaléia, fotofobia e sintomas de resfriado. A recuperação clínica ocorre dentro de uma a duas semanas. Em áreas endêmicas, uma parcela da população rural pode apresentar anticorpos contra o vírus sem manifestar sinais clínicos compatíveis com a doença.

Alguns estudos têm identificado genes virais determinantes de virulência *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, a proteína M parece modular a resposta imune inata em células infectadas e tem sido associada com o aumento da virulência de isolados em camundongos de laboratório. Os sorotipos VSNJV e VSIV apresentam diferenças importantes de virulência; o tipo Indiana produz doença mais grave e se dissemina com maior rapidez por contato entre suínos, e a gG parece ser um importante determinante da virulência.

5.1.3 Imunidade

Três principais componentes da resposta imune atuam na proteção contra o VSV: a imunidade não-específica ou inata (interferon e óxido nítrico, por exemplo), a imunidade humoral (anticorpos) e a imunidade celular (linfócitos citotóxicos). O interferon parece desempenhar um

papel importante na sobrevivência de camundongos inoculados com o VSV. Aliado ao fato de que a proteína de matriz inibe a ação do interferon, esses dados sugerem que essa substância represente um importante mecanismo de defesa contra a infecção viral. Anticorpos neutralizantes contra a glicoproteína do VSV são produzidos rapidamente e em altos títulos após a infecção natural ou experimental e, provavelmente, desempenhem um papel importante na proteção contra o VSV. O mecanismo exato da proteção conferida pelos anticorpos não está completamente elucidado, pois complexos de vírus e anticorpos mantêm a capacidade de ligação à célula-alvo, porém não são infecciosos. A maioria dos bovinos, eqüinos e suínos de regiões endêmicas possui anticorpos neutralizantes anti-VSV. No entanto, parece que a presença de anticorpos neutralizantes não é suficiente para prevenir a doença clínica. A replicação viral, que ocorre predominantemente nos epitélios, poderia ser uma explicação para esse fato.

Experimentos em bovinos e suínos têm demonstrado a proliferação de células mononucleares do sangue periférico em resposta a antígenos do VSV. Essa resposta pode ser detectada três semanas após a inoculação em suínos ou pós-vacinação em bovinos; e pode durar até seis meses. No entanto, o papel da resposta imune celular na proteção contra o VSV é questionável, pois os animais de laboratório, desprovidos de resposta citotóxica direta ou indireta, mas capazes de montar resposta humoral, sobrevivem à infecção.

5.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico diferencial é extremamente importante, principalmente para distinguir a VS da febre aftosa. Os métodos de diagnóstico utilizados incluem o isolamento viral, a detecção de antígenos por ELISA, a fixação do complemento e a imunofluorescência (IFA). Além desses, a detecção de anticorpos por soroneutralização (SN) e determinação de IgM por ELISA são também utilizados. A detecção de IgM em níveis altos indica infecção recente. Outros métodos de detecção viral incluem a RT-PCR (transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia), além do RT-

PCR em tempo real. Amostras de epitélio e fluido vesicular são as indicadas para o diagnóstico. Alternativamente, quando as lesões vesiculares estão ulceradas ou erosivas, pode-se coletar suas bases. O meio de transporte deve conter pH neutro, enviando-se as amostras em gelo, evitando-se congelá-las.

5.1.5 Controle e profilaxia

Em rebanhos ou áreas de ocorrência da VS, a interdição e quarentena devem ser estabelecidas para evitar a disseminação da infecção. Nos rebanhos atingidos, as medidas profiláticas incluem o controle de insetos, limpeza e desinfecção dos recipientes de alimentos e água, equipamentos de ordenha e utensílios que podem veicular o vírus entre os animais. Como a escarificação da pele parece ter influência na penetração do vírus, pastagens altas e feno grosseiro devem ser evitados.

Várias vacinas inativadas, contendo os dois sorotipos (NJ e IN1), têm sido utilizadas na América Central e do Sul. Apesar da eficácia dessas vacinas não ter sido testada, as vacinas bivalentes, contendo adjuvante oleoso, aplicadas a cada seis meses, têm reduzido significativamente a incidência da doença. Outros imunógenos, como vacinas de subunidade e vacinas com o vírus *vaccinia* como vetor da glicoproteína G, têm apresentado sucesso limitado em triagens laboratoriais, porém não têm sido testadas a campo.

5.2 Vírus da raiva e lissavírus relacionados

A raiva, palavra derivada do sânscrito, que significa “fazer violência”, é uma das doenças mais documentadas na história. A doença já era reconhecida há pelo menos 4.000 anos, e muitos dos primeiros registros relacionavam a infecção a mitos e crenças religiosas. Na obra *Ilíada*, Homero referiu-se provavelmente à raiva quando mencionou que Sirius, a estrela mais brilhante do cão da constelação de Orion, exercia uma influência maligna sobre a saúde das pessoas. Demócrito registrou pela primeira vez a raiva canina, cerca de 500 anos a.C. Aristóteles mencionou a “loucura dos cães”, mas acreditava que a enfermidade não

fosse transmitida ao homem. A infecciosidade da saliva de cães raivosos foi documentada pelo escritor romano Cardanus. Este e outros escritores romanos descreveram o material infeccioso presente na saliva como um “veneno”, cuja palavra correspondente em latim é “vírus”; porém, o conceito contemporâneo do termo “vírus” vai muito além do sentido em que foi utilizado naqueles tempos. Somente no século 19 foi demonstrado que a raiva era uma doença contagiosa, quando Zinke (1804) provou que a saliva de um cão infectado, colocada sobre uma ferida aberta de um cão normal, era capaz de transmitir a doença.

As descobertas de Louis Pasteur representaram um marco importante em vários aspectos da microbiologia, especialmente para o estudo da raiva. Entre 1881 e 1885 ele desenvolveu o método de passagens do vírus da raiva em coelhos, originando o que foi denominado “vírus fixo”, ou seja, uma amostra que, quando inoculada, apresentava um período de incubação “fixo” (7-8 dias) e causava morte dos coelhos ao 11º-12º dia. Essa amostra foi a base para que Pasteur e seus colaboradores desenvolvessem a primeira vacina contra a raiva. Para tanto, buscando inativar o agente pelo calor brando, Pasteur mantinha medulas de coelhos dessecando em estufa a 37°C. Após 9 a 10 dias de incubação, a patogenicidade do agente era reduzida.

Pasteur elaborou, então, um esquema de vacinação, no qual o cão a ser vacinado era inoculado com suspensões de tecido gradativamente menos dessecadas. A série de injeções iniciava com suspensões de medulas dessecadas por 9-10 dias e, assim, progressivamente com material dessecado por 8, 7, 6, 5, 4, 3 e 2 dias. Esse procedimento foi, em 1885, aplicado no menino Joseph Meister, que sobreviveu a uma agressão de um cão raivoso (o menino apresentava mordidas em várias partes do corpo, inclusive na cabeça). Os procedimentos criados por Pasteur foram adotados por muitos anos e, apesar das inúmeras modificações ao longo dos anos, serviram de base para muitos processos de atenuação e vacinação ainda hoje amplamente utilizados.

Em 1903, Adelchi Negri descreveu os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos característicos em neurônios, os quais eram quase sem-

pre detectados em animais infectados pelo vírus da raiva. Na verdade, o dr. Negri acreditava que as inclusões fossem o agente causador da raiva, que ele imaginava tratar-se de um protozoário. Ele descreveu o achado de inclusões redondas ou ovais, que denominou *Negri body*, ou corpúsculos de Negri, com tamanho variando entre 0.25 a 27 µm, encontradas freqüentemente nas células piramidais dos cornos de Amon e nas células de Purkinje do cerebelo, podendo ser encontradas em células da medula e outros gânglios nervosos. As inclusões podem ser visualizadas por colorações de Mann, Giemsa ou pelo método de Seller, onde aparecem com uma coloração carmim ou magenta, contendo em seu interior grânulos mais escuros, basofílicos. A identificação desses corpúsculos foi, por muitos anos, até o advento da imunofluorescência, a principal ferramenta utilizada no diagnóstico rápido da raiva. A partir dos anos 1960, a imunofluorescência direta tornou-se, em função de sua grande sensibilidade e especificidade, o principal método de diagnóstico rápido de raiva, assim permanecendo até o presente.

5.2.1 O agente

O vírus da raiva (RabV) pertence a ordem *Mononegavirales*, a qual compreende todos os vírus que possuem genoma formado por uma única molécula de RNA, de polaridade negativa (ICTVdB, 2007). Dentro dessa ordem, o RabV é classificado na família *Rhabdoviridae*, no gênero *Lyssavirus* (ICTVdB, 2007), juntamente com outros vírus denominados “vírus relacionados à raiva”, os quais apresentam semelhanças antigênicas com o RabV. Posteriormente, pelo uso de métodos de análise filogenética, o gênero *Lyssavirus* foi subdividido em seis genótipos distintos, sendo o RabV classificado como genótipo 1 e protótipo do gênero. Os demais lissavírus são classificados em outros seis genótipos distintos. Os genótipos 5 e 6, correspondentes aos lissavírus de morcegos europeus, foram subdivididos em subtipos. Além desses, outros quatro novos genótipos foram propostos, representados pelos vírus Aravan, Khujand, Irkut e West Caucasian, todos isolados de morcegos. Os membros do gênero *Lyssavirus* estão listados na Tabela 27.2. Em

Tabela 27.2. Membros do gênero *Lyssavirus*: classificação genotípica e distribuição geográfica.

Genótipo	Nomenclatura	Distribuição geográfica
Genótipo 1	Vírus da raiva (RabV)	Mundial
Genótipo 2	Lagos bat	África
Genótipo 3	Mokola	África
Genótipo 4	Duvenhage	África
Genótipo 5	Lissavírus europeu de morcegos 1 (EBL) 1)	Europa
Genótipo 6	Lissavírus europeu de morcegos 2 (EBL) 2)	Europa
Genótipo 7	Lissavírus australiano de morcegos (ABL)	Austrália
Novos genótipos propostos	Arayan Khujand Irkut West Caucasian (Morcegos)	Ásia Central

relação à patogenicidade e imunogenicidade, o gênero foi subdividido em dois filogrupos: o filogrupo I compreende todos os vírus que causam encefalites fatais semelhantes à raiva em humanos; o filogrupo II é formado pelos vírus Mokola e “Lagos bat”, que são menos patogênicos para humanos, embora o Mokola já tenha sido detectado em casos de encefalite.

O RabV é envelopado e, como tal, sensível a detergentes e solventes lipídicos. Sua resistência fora do hospedeiro é baixa, e rapidamente inativado a temperaturas altas, sendo destruído a 50°C durante 15 minutos. É sensível ao dessecação, luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, soda cáustica a 2%, solventes de gorduras (éter, clorofórmio) e formalina. O vírus se mantém estável por longos períodos a 4°C, porém se conservado a -20°C em tecidos mergulhados em glicerina tamponada (pH 7,2-7,6), o vírus se mantém por vários anos. A -70°C ou temperaturas mais baixas, o vírus se mantém viável indefinidamente.

A multiplicação do RabV em cultivos celulares representou um grande avanço nas pesquisas e no desenvolvimento de vacinas. Uma grande variedade de cultivos de células neurais e não-neurais, incluindo pelo menos duas dezenas de cultivos primários e outras tantas linhagens hete-

roplóides, são utilizadas. As células de linhagem de rim de hamster BHK-21 (de *baby hamster kidney*) são freqüentemente utilizadas para o cultivo do RabV com diversas finalidades, sendo usadas inclusive para a produção de vacinas para animais. As células de rim de macaco-verde africano (VERO) e as linhas de células diplóides humanas WI-38 e MRC-5 são usadas para produção de vacinas para uso humano. As células de linhagem derivadas de neuroblastomas têm sido freqüentemente utilizadas para diagnóstico e isolamento de amostras de campo. Uma linhagem de glioma de rato, denominada C6, tem sido utilizada por pesquisadores brasileiros. O RabV não causa efeito citopático quando cultivado em células *in vitro*, o que torna necessário algum tipo de teste complementar para o acompanhamento da evolução da infecção nas células. Isso geralmente é feito por testes que dependem de anticorpos ligados a substâncias fluorescentes ou a enzimas, como a peroxidase.

5.2.2 Estrutura do vírion

Os vírions apresentam a forma característica da família, que lembra um projétil de revólver, com cerca de 75 nm de diâmetro e comprimento entre 100 e 300 nm. A partícula apresenta-se

como um denso cilindro formado pelo genoma disposto em formato de mola e envolto em uma proteína denominada nucleoproteína (N). Este conjunto forma, junto com moléculas de outras três proteínas estruturais (P, M e L), o nucleocapsídeo, que apresenta simetria helicoidal. O nucleocapsídeo, por sua vez, é envolto em um envelope, que deriva das membranas celulares. Nesse envelope, estão inseridos trímeros de moléculas da glicoproteína G, que atravessa o envelope e projeta suas espículas para a parte externa do vírion.

O genoma viral é uma cadeia de RNA de fita simples, com um tamanho aproximado de 12 kb e com uma massa molecular de $4,6 \times 10^6$ kDa. O genoma codifica cinco proteínas, na seguinte ordem: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P, previamente denominada M1), a proteína da matriz (M, previamente denominada M2), a glicoproteína (G) e a RNA polimerase dependente de RNA (L). O gene conta ainda com duas regiões intergênicas não-codificantes, situadas entre os genes que codificam M e G e entre os genes que codificam G e L. Esta última foi previamente chamada de pseudogene, mas trata-se de uma região não-codificante, indicativa de relações evolutivas com outros vírus de genoma de RNA não-segmentado de polaridade negativa, como os membros da família *Paramyxoviridae*.

A glicoproteína G (525 aminoácidos, 65-70 kDa) é responsável pela adsorção do vírus à célula hospedeira e pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, além de participar do processo de brotamento de novos vírions. Além disso, a gG é a maior responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, principalmente por sua porção externa do envelope, denominada domínio antigênico ou ectodomínio. A gG também é capaz de estimular, em conjunto com as proteínas N e P, células T auxiliares e citotóxicas, gerando uma resposta imune celular. Alguns sítios de G são relacionados com a patogenicidade de amostras de vírus. A proteína N (450 aminoácidos, 58-62 kDa) também é capaz de induzir anticorpos neutralizantes, apresentando ainda epítomos importantes para o reconhecimento de linfócitos T. A proteína N é a mais conservada dentre as proteínas dos lissavírus, está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da

ação de ribonucleases. A N desempenha outras atividades importantes: é fundamental na regulação da transcrição do RNA viral, participando ativamente na encapsidação de novas moléculas de RNA genômico sintetizadas e no transporte axoplásmico intraneuronal.

A proteína L (2128 aminoácidos, 190 KDa), é uma subunidade da RNA polimerase viral, que é complementada com P e N para formar o complexo que transcreve o genoma. Além dessa atividade, a L detém ainda várias outras atividades enzimáticas, como a formação do cap, metilação, poliadenilação e atividade de proteína quinase, além de estar envolvida na inicialização da cadeia de RNA. A proteína L é ativada pela interação com P (298 aminoácidos, 35-40 KDa). Esta, por sua vez, é a menos conservada entre os lissavírus. A proteína P liga-se à dineína intracitoplasmática e está envolvida no transporte axonal do vírus. A proteína M (203 aminoácidos, 22-25 KDa), por sua vez, preenche o espaço entre o ribonucleocapsídeo e o envelope, e promove a montagem das partículas, aproximando membranas, RNP e G, exercendo um papel ativo no brotamento dos novos vírions.

5.2.3 Replicação viral

A adsorção do vírus à célula hospedeira é mediada pelos trímeros da gG, que interagem com os receptores celulares e promovem a fusão e internalização dos vírions. Não é descrito um receptor específico para o RabV e, possivelmente, diferentes receptores são utilizados em diferentes células para ocorrer a penetração do vírus. Alguns estudos evidenciaram a adsorção aos receptores de acetilcolina; outros observaram que oligossacarídeos e lipoproteínas, como o ácido siálico de gangliosídeos, podem também ter participação na adsorção. As moléculas de adesão neurais (*neural cell adhesion molecules* ou NCAM), assim como a proteína denominada “receptor de neurotrofinas p75” (p75NTR) foram também apontadas como possíveis receptores para o RabV. Após a adsorção à célula hospedeira, o vírion penetra na célula por fagocitose, sendo englobado por uma vesícula formada pela membrana celular. Essas vesículas são ricas em uma proteína denominada clatrina. Eventualmente, a vesícula contendo o vírion

funde-se com lisossomos, liberando a RNP no citoplasma celular e permitindo que seja iniciado o processo de transcrição e replicação viral.

Uma vez no interior da célula, o genoma de polaridade negativa é inicialmente transcrito e ocorre a produção de proteínas. Para tanto, a RNA polimerase viral transcreve o genoma em um RNA líder e cinco mRNAs, todos os cinco com cap e poli-adenilados, tal como os mRNA celulares. A transcrição diminui sua eficiência em cerca de 30% nas junções dos genes N-NS, NS-M e M-G, resultando em um efeito cumulativo na expressão gênica, ou seja, a expressão é mais eficiente na extremidade 3' do genoma. Como descrito anteriormente, esse processo é denominado atenuação da transcrição. Os mensageiros são traduzidos nas proteínas N, P, M, G e L em ribossomos livres no citoplasma. A proteína G, que requer glicosilação, recebe carboidratos no retículo endoplasmático rugoso e é transportada via complexo de Golgi para a membrana citoplasmática. A replicação do genoma viral ocorre somente após a tradução dos mRNAs. A proporção entre a quantidade de RNA e da proteína N no interior do citoplasma regula o processo de troca do processo de transcrição para replicação. O primeiro passo na replicação é a síntese de cópias de polaridade positiva (ou antígenômica) de todo o genoma viral. Para que estas sejam geradas, os sinais de transcrição representados por códons de parada e continuação de leitura são ignorados; a RNA polimerase reconhece a extremidade 3' e sintetiza uma cópia complementar com a extensão do genoma. Essas cópias positivas servirão de molde para a síntese de novos genomas (de polaridade negativa) que irão fazer parte dos novos vírions.

Durante a montagem, um complexo formado pelas proteínas N, P e L promove a encapsidação dos novos genomas. A proteína M envolve a RNP; esse complexo vai para uma área da membrana citoplasmática (ou vesículas membranosas internas) e M inicia o “enovelamento” da partícula, conferindo-lhe o formato de “mola”, que caracteriza a disposição helicoidal da RNP. A seguir, as partículas ligam-se à membrana celular em regiões onde foram inseridos trimeros da gG, originando o envelope viral. Esse processo não

produz lise das células infectadas; em cultivos *in vitro*, as células infectadas podem permanecer por longos períodos viáveis e liberando novos vírions por brotamento.

5.2.4 Variações antigênicas

O RabV tem sido considerado como um vírus bastante estável. Algumas das amostras de vírus vacinais ainda hoje utilizadas são derivadas do vírus isolado por Pasteur no final do século XIX. Uma amostra do RabV de Pasteur foi submetida a 3.080 passagens em coelhos até 1953, e foram evidenciadas poucas alterações em sua patogenicidade. Não obstante, essa estabilidade não é absoluta. Os métodos então disponíveis – baseados essencialmente na inoculação de animais de experimentação – eram muito pouco sensíveis para a detecção de variações mais sutis. Apesar disso, já na década de 1950, os estudos de Fuenzalida e Palácios (1955) apontavam para diferenças antigênicas significativas entre amostras do RabV. Nos anos 1980, com a aplicação de anticorpos monoclonais (AcMs) para o estudo do RabV, as variações antigênicas tornaram-se mais evidentes. Esses estudos revelaram que amostras de vírus originárias de diferentes espécies hospedeiras naturais apresentavam “variantes” com características antigênicas particulares, sugerindo a ocorrência de adaptações de amostras do vírus a um determinado hospedeiro. Essas variantes são bastante estáveis, pois a passagem de amostras em um hospedeiro terminal não modifica suas características antigênicas (por exemplo, amostras de RabV isoladas de bovino geralmente apresentam perfil de amostras isoladas em morcegos hematófagos).

A caracterização antigênica de amostras do RabV é realizada por testes de imunofluorescência indireta, nos quais a reatividade dessas amostras (multiplicadas em camundongos ou cultivos celulares) é determinada frente a painéis de AcMs contra antígenos da proteína N. No Brasil, dois painéis de AcMs têm sido utilizados. Um deles é constituído por oito AcMs preparados contra diversas amostras de RabV, fornecido pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, USA, e preestabelecido pela OPAS para o estu-

do de amostras isoladas nas Américas. Com esse painel, foram identificadas, no Brasil, as variantes 2 (principalmente em cães, com perfil típico de amostras de raiva urbana), 3 (identificada em morcegos *Desmodus rotundus*), 4 (de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*), 5 (de morcegos hematófagos da Venezuela, isolada de uma raposa ou cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* no Brasil) e 6 (isolada de um morcego insetívoro *Lasiurus cinereus*), além de algumas amostras com perfis atípicos que não puderam ser enquadradas nessa classificação. O outro painel é composto por 14 AcMs anti-N preparados contra antígenos de diferentes lissavírus (Labos bat, Mokola, Duvenhage e Danish bat), por King (1991), no *Central Veterinary Laboratory* (hoje denominado *Central Veterinary Agency*), Weybridge, Grã-Bretanha. O mesmo foi ampliado pela inclusão de outros dois AcMs preparados no Brasil contra antígenos da amostra CVS de RabV. Quatro AcMs desse painel permitiram a diferenciação entre variantes de morcegos hematófagos, morcegos não-hematófagos, cães, e um outro grupo incluindo uma amostra de cão, um isolado de um caso humano e uma amostra padrão do RabV, denominada "PV".

Estudos sobre variantes antigênicas têm sido complementados por análises genômicas, possibilitando a identificação de variantes genotípicas do RabV. Esses estudos têm conduzido a uma profunda reavaliação do conhecimento a respeito da epidemiologia da infecção e da distribuição do vírus na natureza.

5.2.5 Epidemiologia

O RabV está presente em todos os continentes, com exceção da Austrália e Antártica. Alguns países (Inglaterra, Irlanda, Japão e países escandinavos) obtiveram sucesso na erradicação da doença. Já os lissavírus de outros genótipos, apresentam distribuição geográfica bem mais limitada (Tabela 27.2). Até o presente, nas Américas, todas as amostras do gênero *Lyssavirus* isoladas pertencem ao genótipo 1, que compreende a totalidade das amostras "clássicas" do vírus.

O hospedeiro natural ou reservatório natural é a espécie na qual o vírus é capaz de se perpetuar sem a necessidade da sua reintrodução a partir

de outras espécies. Os hospedeiros naturais são os principais vetores da infecção, sendo capazes de transmitir o vírus entre indivíduos da mesma espécie e também a outras espécies envolvidas. Essas, quando eventualmente infectadas, geralmente são "hospedeiros finais" ou "terminais" da infecção, pois o ciclo é terminado por ocasião da morte do hospedeiro, usualmente sem haver chance para nova transmissão.

– Ciclos da raiva

Na natureza, o RabV é mantido por ciclos ocasionalmente inter-relacionados, denominados ciclos urbano e silvestre, aéreo e rural. Ciclo "urbano" refere-se à raiva em cães e gatos domésticos; ciclo aéreo refere-se à raiva em morcegos, sendo os demais ciclos denominados ciclos "terrestres". Ciclo "rural" refere-se à raiva dos herbívoros, que envolve principalmente os bovinos e eqüinos, e na qual o principal vetor é o morcego hematófago. O termo "silvestre" refere-se à raiva associada a espécies silvestres, e pode englobar o ciclo aéreo. O ciclo urbano tem sido controlado por meio de vacinação de animais de companhia de várias regiões do Brasil. Porém os ciclos silvestre e rural ocorrem em diversas regiões. No ciclo silvestre, o vírus pode utilizar diferentes espécies como reservatório, que podem variar em função da fauna da região geográfica considerada. Assim, na Europa, o principal reservatório natural do vírus em seu ciclo silvestre é a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*); na América do Norte, são as raposas-vermelhas, os gambás (*Mephitis mephitis*) e guaxinins (*Procyon lotor*), que são também hospedeiros naturais do vírus. Na América Latina, os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são os principais hospedeiros silvestres do vírus (Tabela 27.3). Em função de seus hábitos alimentares, os morcegos hematófagos são os principais transmissores da infecção a bovinos. Não obstante, na indisponibilidade de bovinos para sua alimentação, os morcegos *D. rotundus* podem atacar outras espécies na busca de alimento, inclusive humanos. Em um episódio, morcegos hematófagos foram responsáveis por uma epidemia de raiva humana, entre pessoas com o costume de dormir ao ar livre em redes, tornando-se presas

Tabela 27.3. Principais reservatórios da raiva silvestre e distribuição geográfica.

Região	Reservatórios
Europa	Raposa vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)
Estados Unidos	Coioate (<i>Canis latrans</i>), texugo (<i>Meles meles</i>), guaxinim (<i>Procyon lotor</i>), gambá (<i>Mephitis mephitis</i>)
América Latina	Morcego hematófago (<i>Desmodus rotundus</i>), raposa (<i>Dusicyon vetulus</i>), jaritacac (<i>Conepatus</i> sp.), guaxinins (<i>Procyon cancrivorus</i>), sagüis (<i>Calithrix</i> sp.), diversas espécies de morcegos não-hematófagos e canídeos selvagens

fáceis para morcegos hematófagos. As duas outras espécies de morcegos hematófagos conhecidas, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*, alimentam-se geralmente de sangue de aves, embora *D. ecaudata* já tenha sido observado alimentando-se de sangue humano. Ambas as espécies podem ser contaminadas pelo RabV, mas a sua participação na manutenção da infecção no ciclo silvestre da raiva não é significativa.

A epidemiologia da raiva vem sendo examinada, e animais soropositivos de várias espécies, sem a presença de sinais clínicos, têm sido identificados. Esses estudos têm incluído mangostas, morcegos hematófagos e insetívoros, guaxinins, gambás, raposas, hienas, chacais e cães selvagens e domésticos na Etiópia.

Sílvio Torres e Queiroz de Lima (1936) e Pawan (1936) já haviam registrado a possibilidade de morcegos hematófagos tornarem-se portadores da infecção; porém, em função dos métodos disponíveis à época, as evidências apresentadas deixaram margem a dúvidas. Não obstante, mais recentemente, na Etiópia, isolou-se repetidamente vírus infeccioso de cães assintomáticos, assim como na Nigéria, adicionando ainda mais evidências à possibilidade de ocorrência de infecções não-fatais. O RNA viral foi detectado em hienas na África, sugerindo a ocorrência de amostras de baixa patogenicidade nesta espécie. Assim, apesar de ainda não estar completamente esclarecida a interação do vírus com seus hospedeiros, em algumas espécies animais, o vírus é capaz de perpetuar-se, seja por causar infecções não-fatais, seja por manter-se no hospedeiro tempo suficien-

te para permitir que o animal infectado transmita a infecção a outros hospedeiros em sua comunidade, antes de sua morte.

A maioria das infecções pelo vírus da raiva ocorre por transmissão percutânea, através da mordedura de animais infectados. A transmissão por via aérea pode ocorrer raramente, mas não tem significância epidemiológica para o ciclo da infecção. O contato com ferimentos abertos e membranas mucosas pode, ocasionalmente, levar à transmissão do vírus, assim como procedimentos médicos, como transplantes de córneas e outros órgãos (transmissão iatrogênica). Foram relatados casos de raiva humana na Europa e EUA, onde a infecção ocorreu pelo transplante de órgãos sólidos (rins, pulmões, fígado e pâncreas) provenientes de doadores com encefalite de origem desconhecida. Esse fato salienta a importância da inclusão de testes específicos para o diagnóstico de raiva em potenciais doadores de órgãos, particularmente se apresentaram sinais de comprometimento neurológico.

5.2.5.1 Situação da raiva no Brasil

– Raiva urbana

A raiva, no Brasil, apresenta-se em níveis distintos nas diferentes regiões do país. Na região Sul, a raiva urbana tem sido controlada. Os últimos casos em humanos nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina ocorreram em 1981. No Paraná, o último caso humano foi registrado em 1987. Porém, casos de raiva urbana associados com outras fontes de transmissão têm ocorrido na região Sul ocasionalmente. Em 2001, no Rio Grande do Sul, um felino foi infectado por uma variante de origem de morcegos não-hematófagos. Em 2007, um caso de raiva foi relatado em um cão infectado com uma variante frequentemente detectada em morcegos insetívoros. Não obstante, apesar desses episódios isolados de contaminação com amostras originárias de outros hospedeiros naturais, as variantes do RabV que tem como hospedeiro natural o cão, não têm sido detectadas em populações caninas na região Sul.

As demais regiões do país ainda apresentam casos de raiva urbana, porém o número está em declínio. Ocorreu um decréscimo nos casos notificados de raiva entre caninos e felinos no Brasil entre 1997-2006 (Tabela 27.4). Até 2003, os cães eram os principais vetores da raiva para humanos, porém, a partir deste ano, os casos em humanos causados por cães foram suplantados pelas infecções transmitidas por morcegos (Tabela 27.5). Observa-se no período uma significativa redução dos casos de raiva urbana provocados por cães e gatos. Até 2003, os cães foram responsáveis pela transmissão de 119 (84%) de 141 casos humanos.

Em 2004 e 2005, os casos notificados de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos apresentaram um incremento importante em decorrência de surtos ocorridos na região Amazônica, e esses morcegos tornaram-se os principais transmissores da infecção a humanos. Como consequência, em 2005, observou-se o maior número de casos de raiva humana registrados no decênio. Dos 80 casos notificados no triênio 2004-2006, morcegos hematófagos foram implicados em 66 (82,5%) ao passo que cães estiveram envolvidos somente em 12 episódios (15%).

Tabela 27.4. Casos notificados de raiva em animais no Brasil no decênio 1997-2006 (não computados os registros de raiva bovina)

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Caninos	945	1746	970	761	657	617	289	104	93	97
Gatos	65	165	93	69	27	67	21	10	10	7
Morcegos hematófagos	0	0	4	8	72	12	11	19	60	50
Morcegos não-hemat.	0	0	0	20	27	2	8	30	136	25
Morcegos não-ident.	0	0	6	2	2	55	94	38	0	0
Animais Silvestres	36	36	37	61	144	89	155	124	251	208

Tabela 27.5. Casos de raiva em humanos e espécie de animal transmissor no Brasil (1997-2006)

Espécie transmissora	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Bovino	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2
Cão	17	19	21	24	18	6	14	5	1	6	131
Gato	3	2	-	1	1	-	-	1	-	-	8
Morcegos hematófagos	-	-	-	-	-	3	3	22	42	2	72
Morcegos não-hematófagos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morcegos espécie indeterminada	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	6
Guaxinim (<i>Procyon</i> sp.)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Macaco	-	3	-	1	2	-	-	-	1	-	7

– Raiva em morcegos e animais silvestres terrestres

A notificação dos casos de raiva em morcegos aumentou significativamente nos últimos anos, no período de 1997-2006 (Tabelas 27.4 e 27.5). Aumentaram ainda os registros de casos em animais silvestres terrestres nesse período. Particularmente preocupantes são os registros de casos em morcegos não-hematófagos, pois sua adaptação ao ambiente urbano pode dar margem a infecções humanas. Apesar disso, até o presente ainda não foi registrado no Brasil nenhum caso de raiva humana transmitida por morcegos não-hematófagos (Tabela 27.5).

– Raiva dos herbívoros

Além dos problemas causados à saúde pública, a raiva traz sérios prejuízos econômicos à pecuária nacional, e tem sido responsável, nos últimos dez anos, por mais de 23.000 casos notificados em herbívoros. Salienta-se que a subnotificação de casos de raiva em herbívoros é uma realidade, de forma que é praticamente impossível determinar o número preciso de perdas associadas à doença. Os casos notificados de raiva dos herbívoros no Brasil no decênio 1997-2006, reportados aos órgãos oficiais, são apresentados na Tabela 27.6. Na região Sudeste, ocorreu um aumento nos casos de raiva notificados em herbívoros, provavelmente em função de uma maior eficácia na notificação. Na região Nordeste, os casos em

ovinos e caprinos representam uma parcela significativa dos casos de raiva em herbívoros.

5.2.6 Patogenia, sinais clínicos e patologia

O período de incubação da raiva é muito variável após infecções naturais. Muitos fatores podem estar associados a um período de incubação mais ou menos prolongado, tais como a amostra de vírus envolvida, o local da mordedura (quanto mais próximo do sistema nervoso central, mais rápido o transporte do vírus), a carga viral inoculada, a suscetibilidade da espécie exposta e imunidade do animal agredido. Geralmente, o período de incubação é de 14 dias a 12 semanas, porém períodos superiores a um ano já foram relatados.

No hospedeiro infectado, o vírus pode replicar nas células musculares, próximas ao local da inoculação, antes de invadir o sistema nervoso central (SNC). Esta multiplicação é importante para a posterior invasão do SNC, porém, ocasionalmente, pode ocorrer o transporte direto do vírus sem a replicação prévia no local de entrada. O vírus pode utilizar uma combinação de sistemas para atingir o SNC, envolvendo o fluxo axoplásmico retrógrado (provavelmente utilizando o sistema motor celular envolvendo a dineína, passagem célula-célula via junções sinápticas e passagem direta do vírus através de conexões intercelulares). No SNC, o vírus replica e se dissemina via nervos periféricos, de forma centrífuga, para os tecidos não-neurais do organismo. An-

Tabela 27.6. Casos de raiva dos herbívoros notificados no Brasil, por região, no decênio 1997-2006.

Regiões	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Norte	68	74	61	2676	235	346	662	185	138	nd*	4445
Nordeste	406	269	374	302	198	226	226	257	309	nd	2567
Sul	48	81	52	77	60	193	140	147	158	nd	956
Sudeste	2335	2360	2666	2835	1324	1201	863	512	500	nd	14596
Nordeste	406	269	374	302	198	226	226	257	309	nd	2567
Centro-Oeste	94	240	254	409	697	824	761	725	806	nd	4810
TOTAL	2951	3024	3407	6299	2514	2790	2652	1826	1911	961**	27374

nd* : não disponível, ** total de casos registrados em 2006 (SIEPI, 2007).

tígenos podem ser detectados em praticamente todos os tecidos de animais infectados. O vírus replica nas glândulas salivares, e a excreção pela saliva é o principal mecanismo de disseminação e perpetuação do mesmo na natureza, permitindo a inoculação pela barreira cutânea e a introdução do RabV nos tecidos do novo hospedeiro após a mordedura.

A apresentação clínica da raiva pode ser muito variável, pois os sinais de comprometimento neurológico podem se apresentar de forma distinta. As apresentações clássicas da doença são as formas furiosa e/ou paralítica. A forma furiosa é mais freqüente em caninos, que apresentam alterações de comportamento como inquietação (hiperexcitabilidade, agressividade), fotofobia, salivação, insônia e ocasionalmente febre. Na forma paralítica, o animal apresenta dificuldade de deglutição, pela paralisia muscular; podendo haver alteração do tom de voz do animal. Com o progresso da doença, os membros posteriores também podem ficar paralisados. Ocorre a evolução do quadro em quatro a cinco dias, com desfecho fatal. A paralisia do maxilar inferior promove a impossibilidade de deglutição, e a salivação típica da forma paralítica da doença. Pode-se observar ainda um aumento do limiar de sensibilidade a tranqüilizantes e sedativos e, se anestesiados, os cães podem apresentar alucinações e convulsões no período pós-anestésico. A morte súbita do animal também é relatada, sem que ocorra a manifestação de qualquer sinal clínico.

Em bovinos, a forma paralítica é a apresentação mais comum. A paralisia aguda, progressiva, flácida, manifestada inicialmente nos membros posteriores, é o sinal mais aparente. Podem ocorrer ainda sinais indicativos de comprometimento dos nervos lombares e sacrais, como constipação, tenesmo, parafimose em machos e gotejamento de urina. Em eqüinos, é relatada a lesão no local de inoculação do vírus; hiperexcitabilidade e paralisia da faringe, esôfago e dos membros posteriores.

Durante vários anos, acreditou-se que a infecção com o RabV em morcegos era freqüentemente subclínica. Entretanto, na década de 1980, foi evidenciado que os morcegos, assim como outros mamíferos, desenvolvem sinais clínicos típicos da raiva, com período de incubação va-

riável, apresentando como desfecho a morte. A constatação de morcegos soropositivos sem sinais clínicos aparentes sugere que deve haver outros tipos de interação vírus-hospedeiro que não conduzam invariavelmente a morte. Entretanto, a ocorrência de portadores ou infecções subclínicas em quirópteros é, ainda, questão de debate. O período de incubação da raiva em morcegos é extremamente mutável, variando de semanas a períodos maiores que um ano. Os principais sinais da doença em morcegos hematófagos são: atividade alimentar diurna, hiperexcitabilidade e agressividade, incoordenação motora, tremores musculares, paralisia e morte. Nos morcegos não-hematófagos, ocorre geralmente paralisia sem agressividade e excitabilidade, e os espécimes são encontrados em locais não-habituais. Nestas espécies, em infecções experimentais, o período de incubação pode variar entre duas a 25 semanas.

O exame histopatológico do encéfalo de animais que morrem devido à infecção pelo RabV revela meningite e encefalomielite não-supurativa. Podem ainda ser detectados os corpúsculos de Negri, considerados patognomônicos da infecção. As alterações patológicas são mais facilmente observadas quando os tecidos são colhidos após a morte do animal em consequência da infecção. Se o animal for sacrificado em estágios precoces da enfermidade, as lesões e os corpúsculos de Negri podem não ser evidentes. As secções do encéfalo mais indicadas para o exame histopatológico incluem os cornos de Amon, córtex cerebral, tronco cerebral, cerebelo e medula espinal.

5.2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da raiva não deve ser baseado apenas em observações clínicas, especialmente porque outras enfermidades podem originar sinais semelhantes. Paralelamente ao exame clínico, é fundamental a análise da situação epidemiológica, a história da infecção na região, a presença de possíveis vetores contaminados e a possibilidade da introdução de animais oriundos de áreas endêmicas. A associação desses dados permitirá um diagnóstico presuntivo, que deve ser confirmado por testes laboratoriais.

– Diagnóstico virológico

O tecido de eleição para o diagnóstico de raiva é o encéfalo dos animais suspeitos. Em eqüinos, além do encéfalo, recomenda-se enviar ao laboratório fragmentos de medula. As regiões do encéfalo, preferencialmente submetidas para diagnóstico, incluem porções do cerebelo, córtex e circunvoluções do hipocampo (ou cornos de Amon). Animais pequenos (p. ex.: morcegos, gambás, sagüis) devem ser remetidos inteiros ao laboratório. A cabeça do animal suspeito também pode ser remetida ao laboratório. As amostras deverão ser remetidas sob refrigeração. Em locais em que não há condições de manter o espécime refrigerado, recomenda-se a imersão de fragmentos de tecido em Líquido de Vallée (glicerina 50% tamponada com tampão fosfato: KH_2PO_4 1,80 g; $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 2,30 g; glicerina neutra, 50%; H_2O q.s.p. 1000 mL; pH 7,4-7,8). Nesse líquido, o vírus pode ser detectado se mantido por alguns dias.

O diagnóstico de raiva na primeira metade do século 20 baseou-se fundamentalmente na pesquisa das inclusões ou corpúsculos de Negri no encéfalo de animais infectados. Essa prova apresenta sensibilidade e especificidade baixas, pois as inclusões são detectadas em média em 60 a 70% (amplitude de 40 a 90%) dos casos positivos. A variação na sensibilidade para a detecção de inclusões também ocorre em relação à espécie, como para os eqüinos, em que a eficácia da detecção de corpúsculos de Negri é menor.

Em 1958, a técnica de imunofluorescência direta (IFD) foi adaptada para a detecção de antígenos do RabV. A IFD é realizada em impressões de tecido fresco sobre lâminas de microscopia e permite a obtenção do resultado em poucas horas. A IFD chega a atingir sensibilidade e especificidade próximas a 100% em relação à inoculação em camundongos. Essas qualidades, aliadas à rapidez na obtenção dos resultados, tornaram a IFD a técnica de eleição para o diagnóstico rápido de raiva. Para assegurar sua precisão, a IFD é acompanhada por um teste de confirmação biológica, no qual o material suspeito é inoculado por via intracerebral em camundongos lactentes. Os camundongos inoculados desenvolvem sinais neurológicos e morrem entre 8 e 23 dias após a

inoculação. A confirmação da *causa mortis* é feita através de nova IFD no tecido encefálico dos camundongos inoculados. Para reduzir a utilização de animais, há uma tendência para a substituição da inoculação de camundongos pela inoculação em cultivos celulares. Diversas linhagens celulares são suscetíveis ao RabV, sendo as células de origem de rim de hamster (*baby hamster kidney*, BHK) e células de linhagens de neuroblastoma (NA ou N2A) as mais utilizadas para fins de diagnóstico.

Métodos moleculares vêm conquistando espaço no diagnóstico e caracterização do RabV. A maioria deles baseia-se na transcrição reversa de determinado segmento do genoma viral, seguida de amplificação pela reação da polimerase em cadeia (RT-PCR). Os amplicons podem ter sua especificidade confirmada com a aplicação de sondas. Os fragmentos de DNA assim gerados (amplicons) podem ser clivados com enzimas de restrição, clonados ou, ainda, seqüenciados para estudos mais detalhados, como a caracterização genômica das amostras isoladas.

– Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico, ou seja, baseado na identificação de anticorpos específicos anti-RabV, pode ser utilizado com vários objetivos. Frequentemente tem sido empregado para avaliar a capacidade imunogênica de vacinas anti-rábicas, bem como para avaliar o *status* sorológico de populações submetidas à vacinação. A elevação dos títulos de anticorpos no líquido cefalorraquidiano é considerada diagnóstica em casos suspeitos e é muito utilizada para o diagnóstico *intra vitam* em humanos. Testes sorológicos igualmente têm sido utilizados para buscar evidências de circulação do vírus em populações não-vacinadas. Assim, entre muitas aplicações, os testes sorológicos têm também contribuído para que muitos dos conceitos sobre a epidemiologia da raiva sejam reavaliados.

A técnica de eleição para a detecção de anticorpos contra o RabV é a soro-neutralização (SN). Nessa prova, uma quantidade determinada de vírus é homogeneizada com diluições do soro a ser testado. Se este possuir anticorpos especí-

ficos, o vírus será neutralizado. Para evidenciar a multiplicação viral, camundongos ou cultivos celulares são inoculados com as misturas vírus/diluições de soro. A SN é utilizada também para verificar os títulos de anticorpos neutralizantes em humanos submetidos à vacinação pré-exposição. Por comparação com um soro de referência, é possível determinar quantas unidades internacionais (UI) de anticorpos neutralizantes uma determinada amostra de soro apresenta.

Outra prova sorológica similar bastante utilizada é o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT, de *rapid fluorescent focus inhibition test*). Nessa prova, a neutralização do vírus pelo soro é revelada pelo bloqueio da reação de um conjugado fluorescente (igual ao utilizado na prova de IFD descrita acima).

Ensaio imunoenzimático do tipo ELISA também tem sido empregados na detecção de anticorpos contra o RabV. Entretanto, esses testes freqüentemente apresentam problemas de especificidade.

Além dos mencionados acima, uma grande variedade de testes sorológicos foi ou vem sendo avaliada para a detecção de anticorpos contra o RabV, incluindo a contra-imunoeletoforese, a inibição da imunoperoxidase e a citometria de fluxo. Entretanto, até o presente, nenhum deles foi capaz de suplantar em eficácia a SN, que permanece como teste sorológico de eleição.

5.2.8 Prevenção e controle

A prevenção da raiva baseia-se na vacinação de hospedeiros e no controle de reservatórios. As principais medidas de controle do ciclo urbano da raiva são a vacinação de caninos e felinos e a captura e eliminação de cães errantes. O número de casos de raiva canina no país tem diminuído significativamente, o que aumenta a importância das ações de vigilância epidemiológica, a fim de prevenir a reintrodução da doença, pois estes animais constituem uma das principais fontes de vírus para humanos. Caso sejam identificados novos focos, o controle desses tem sido baseado na vacinação em massa, focal e perifocal, com vacinas inativadas. Em municípios onde a raiva está controlada, o serviço de vigilância deve ser mantido, o que inclui o exame anual de casos sus-

peitos de raiva canina em um número equivalente a 0,2% da população canina total do município, permitindo, assim, uma avaliação da manutenção do *status* de área indene.

A raiva dos herbívoros é controlada pela vacinação de animais em áreas endêmicas e pelo controle das populações de morcegos hematófagos. Para a vacinação, utiliza-se vacinas inativadas, que representam atualmente 95% das vacinas para bovinos comercializadas no Brasil (estimativa de mais de 100 milhões de doses/ano).

Para o controle das populações de morcegos hematófagos, são geralmente empregados métodos baseados na aplicação tópica de uma pasta contendo uma substância anticoagulante, em morcegos capturados e, posteriormente, liberados para retornar a sua colônia. Como morcegos têm o hábito de higienização pela lambertura mútua, o anticoagulante aplicado pode levar à eliminação de vários indivíduos da mesma colônia. Outros métodos incluem a aplicação de pastas com anticoagulante em bovinos, em feridas de mordeduras de morcegos, por via intramuscular ou intraruminal, porém não são rotineiramente utilizados. O controle da raiva em quirópteros em regiões sinantrópicas tem se tornado alvo da preocupação dos órgãos de vigilância sanitária. As estratégias propostas para o combate à raiva em quirópteros urbanos foram recentemente discutidas no II Seminário de Manejo de Quirópteros em Áreas Urbanas, em São Paulo. Dentre as várias propostas elaboradas, destacam-se as seguintes, que pretendem promover: a) a interação entre órgãos de vigilância e de controle ambiental; b) pesquisa em quirópteros; c) capacitação para o trabalho com morcegos; d) formação de uma rede de laboratórios regionais habilitados à prática com quirópteros; e) incrementar estudos sobre a quiropteroфаuna; e f) conscientização da população sobre o problema.

5.2.9 Tratamento

– Em humanos

O tratamento da raiva apresenta uma peculiaridade: a vacinação, na maioria dos casos, não é aplicada preventivamente (com exceção de profissionais de risco) e sim terapêuticamente. Isso

é possível em função da lenta evolução da infecção, ou seja, pelo período de incubação prolongado, que permite que o hospedeiro desenvolva uma resposta imune protetora quando vacinado após a exposição ao RabV. Conforme a gravidade da lesão e o histórico do animal agressor, diferentes medidas devem ser tomadas com o intuito de que a pessoa exposta não desenvolva a doença (Tabela 27.7).

A Organização Mundial de Saúde recomenda que o tratamento mais eficaz contra a raiva é lavar e enxaguar a ferida ou ponto de contato com bastante água e sabão e, após, colocar etanol, tintura ou solução aquosa de iodo sobre o ferimento. A vacina contra a raiva deve ser aplicada em caso de exposições de nível 2 ou 3. Soro anti-rábico (imunoglobulina anti-rábica) deve ser administrado a todos aqueles que sofreram expo-

Tabela 27.7. Indicações para o tratamento anti-rábico no homem. Recomendações da Organização Mundial da Saúde

Natureza da exposição	Condição do animal agressor		Tratamento recomendado (além do tratamento local)
	No momento da agressão	Durante um período de 10 dias de observação	
Sem lesão, contato indireto	Agressivo	—	Nenhum.
Lambedura			
a) sem lesão cutânea	Agressivo	—	Nenhum.
b) com pele esfolada ou arranhada, ou com mucosas intactas	Sadio	Sinais clínicos de raiva ou diagnóstico de raiva confirmado	Iniciar a vacinação aos primeiros sinais de raiva no animal.
	Sinais clínicos de raiva	Sadio	Iniciar a vacinação imediatamente, suspender o tratamento caso o animal estiver sadio cinco dias após a exposição.
	Agressivo, fugido, ou não se conhece	—	Iniciar a vacinação imediatamente.
Mordeduras			
a) superficiais	a) Sadio	Sinais clínicos de raiva ou diagnóstico de raiva comprovado	Iniciar a vacinação aos primeiros sinais de raiva no animal agressor.
	b) Sinais clínicos de raiva	Sadio	Iniciar a vacinação imediatamente, suspender o tratamento caso o animal estiver sadio cinco dias após a exposição.
	c) Agressivo, fugiu, foi morto ou não se conhece	—	Iniciar a vacinação imediatamente.
	d) Silvestre	—	Soro, imediatamente seguido de vacinação.
b) graves (múltiplas ou na face, cabeça, pescoço ou dedo)	A) Sadio		Soro, deve-se injetar no mínimo 40 unidades internacionais por kg de peso corporal em dose única.
	b) Sinais clínicos de raiva	Sinais clínicos de raiva ou diagnóstico de raiva comprovado	Também pode ser infiltrado 5 ml de soro no tecido afetado, seguido de completa limpeza do ferimento. Imediatamente iniciar a vacinação ao primeiro sinal clínico de raiva no animal agressor.
	c) Raivoso, fugiu foi morto ou não se conhece		Soro, imediatamente seguido de vacinação. A vacina pode ser interrompida se o animal estiver normal cinco dias após a exposição.
	d) Silvestre		

sição de nível 3, assim como para exposições de nível 2 em pacientes imunodeprimidos. O fechamento da ferida (sutura) deve ser evitado, mas, se necessário, deve-se administrar soro anti-rábico previamente, além de tratamento para tétano e outros antimicrobianos que possam ser necessários. Em caso de exposição a animais suspeitos, deve-se buscar imediatamente identificar, capturar ou matar o animal envolvido. No caso de uma exposição de nível 3, o tratamento pós-exposição deve ser iniciado imediatamente, podendo ser interrompido se o animal for um cão ou gato e permanecer sadio após 10 dias de observação. Amostras de tecidos devem ser coletadas dos animais mortos e enviados ao laboratório competente para diagnóstico.

Os gastos orçados para tratamento anti-rábico nos países da América Latina – excluindo o Brasil – foram da ordem de 11 a 22 milhões de dólares. No Brasil, somente em 2004, foram gastos cerca de 28 milhões de dólares em vacinas de animais de estimação e humanas, soro anti-rábico, diagnóstico, pessoal, treinamento de pessoal e campanhas de vacinação de cães. Nessas estimativas, não foram computados os dados referentes à raiva bovina que, segundo levantamento realizado em 1985, foi responsável por perdas estimadas em 100.000 cabeças de gado, com um custo de 30 milhões de dólares.

Uma paciente se recuperou após o desenvolvimento dos sinais clínicos de raiva em Wisconsin, EUA, cerca de um mês após ter sido mordida por um morcego não-hematófago. Não havia a suspeita inicial de raiva, a paciente não recebeu nenhum tipo de tratamento específico pós-exposição, porém desenvolveu títulos crescentes de anticorpos no soro e líquido cefalorraquidiano; em nenhum momento foi isolado vírus nem foi possível identificar a presença genoma viral por métodos moleculares. O tratamento da paciente consistiu em terapia de suporte e medidas neurológicas, com a indução de coma e respiração forçada. Ribavirina foi administrada por via intravenosa. Durante sete dias de coma induzido, a paciente apresentou um aumento gradativo nos títulos de anticorpos anti-rábitos, embora sem confirmação virológica. Acredita-se que este seja o sexto caso humano de recuperação da raiva sem que o paciente tenha recebido nenhum tipo

de tratamento pós-exposição, porém desenvolvendo uma resposta imune específica. O prognóstico, neste caso, é reservado, pois somente um dos demais cinco pacientes que se recuperaram da raiva sem tratamento pós-exposição não apresentou sequelas.

– Tratamento de animais suspeitos

O tratamento de animais suspeitos de raiva é contra-indicado em função do risco que representam para a transmissão do vírus a humanos. Animais suspeitos de raiva devem ser isolados e mantidos em observação em local seguro por um período prolongado.

5.3 Rabdovírus de peixes

Dentre as doenças víricas mais importantes de peixes, várias são causadas por membros da família *Rhabdoviridae*. A comissão de doenças de peixes da OIE (*Office International des Epizooties*) lista três espécies de rabdovírus de notificação obrigatória, que exigem comunicação em 24 horas após a confirmação do diagnóstico. Essas espécies incluem o vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV), vírus da septicemia hemorrágica (VHSV) e vírus da viremia primaveril das carpas (SVCV). Esses vírus causam infecções agudas com alta mortalidade em peixes encontrados na natureza ou em criatórios. Outros rabdovírus de peixes incluem o *Rhabdovirus hirame* (HIRRV) e outros que têm sido isolados de infecções crônicas ou assintomáticas. Neste capítulo, são revisadas as quatro espécies de rabdovírus de peixes mais estudadas e relevantes, ilustrando aspectos importantes sobre os rabdovírus como patógenos veterinários em ecossistemas aquáticos.

5.3.1 Histórico e classificação

A primeira descrição de uma doença severa, chamada de *infectious dropsy of carp*, foi publicada em 1930, porém surtos de doença semelhante haviam sido descritos no início do século em carpas cultivadas em lagoas e, possivelmente, a infecção já ocorria em 1727. Pesquisas realizadas nos anos 1980 demonstraram que o agente etiológico dessa enfermidade é o SVCV. Epidemias em sal-

monídeos, cuja etiologia é atualmente atribuída ao IHNV e VHSV, foram descritas inicialmente entre 1940 e 1950. Porém, especula-se que epidemias da doença produzida por esses agentes já ocorriam no início do século. Devido à contínua ocorrência e importância econômica dessas epidemias, o SVCV, IHNV e VHSV têm sido estudados em nível biológico e molecular. Já o HIRRV foi descrito inicialmente em 1984, e muito pouco se conhece sobre esse vírus. O estabelecimento de linhagens celulares de tecidos de peixes que amplificam eficientemente esses vírus, a partir de 1960, permitiu avanços importantes, facilitando a pesquisa em Virologia de peixes nos últimos 50 anos.

Taxonomicamente, os rabdovírus de peixes são classificados em um de dois grupos antigênicos, baseados nas propriedades das proteínas e em análises filogenéticas de seqüências de genes. O gênero *Novirhabdovirus* abriga o IHNV, o VHSV e o HIRRV, além de outros rabdovírus de peixes menos caracterizados. O segundo grupo inclui o SVCV e vários rabdovírus emergentes de peixes que são muito relacionados aos rabdovírus de mamíferos, e pertencem ao gênero *Vesiculovirus*.

5.3.2 Epidemiologia

– Distribuição geográfica e espectro de hospedeiros

Como grupo, os rabdovírus de peixes possuem uma ampla distribuição geográfica e uma ampla gama de hospedeiros (Tabela 27.8). A infecção por esses vírus é descrita na maioria dos países em que a criação de peixes é realizada em larga escala, incluindo a Ásia, Europa, América do Norte, Rússia e Austrália. Atualmente existem poucas evidências da presença dos rabdovírus em peixes nas Américas Central e do Sul e na África. No entanto, o desenvolvimento das criações de peixes nessas regiões provavelmente será acompanhado do surgimento ou relato desses agentes. Historicamente, a infecção pelo IHNV era limitada aos salmonídeos, incluindo espécies de truta e salmão do pacífico, encontradas na costa oeste da América do Norte. Porém, esse vírus foi introduzido acidentalmente no Japão nos anos 60

Tabela 27.8. Principais rabdovírus de peixes com a sua distribuição geográfica e espécies susceptíveis

Gênero <i>Novirhabdovirus</i>		
Vírus	Local	Hospedeiros
IHNV	América do Norte, Europa e Ásia	Vários gêneros da família <i>Salmonidae</i>
VHSV	América do Norte, Europa e Japão	<i>Salmonidae</i> (trutas) <i>Gadidae</i> (bacalhaus) <i>Clupeidae</i> (arengues) <i>Esocidae</i> (lúcios) <i>Plurionectidae</i>
HIRRV	Japão	<i>Plecoglossidae</i> (ayus) <i>Pleuronectidae</i> <i>Bothidae</i> (flounders)
Vírus semelhantes aos do gênero <i>Vesiculovirus</i>		
SVCV e vírus emergentes semelhantes aos vesiculovírus	América do Norte, Europa e Ásia	<i>Cyprinidae</i> (carpas) <i>Esocidae</i> (lúcios) <i>Salmonidae</i> (trutas) <i>Percidae</i> (perches)

e na Europa nos anos 80 pelo transporte de ovas e de alevinos infectados. Essa transferência intercontinental permitiu o estabelecimento da infecção pelo IHNV como endêmica e epidêmica no Japão, na Europa e América do Norte.

O VHSV foi originalmente descrito como um patógeno de trutas arco-íris de água fresca (*Oncorhynchus mykiss*) em criações do oeste europeu, porém, após os anos 1990, esse vírus tem sido descrito em uma ampla variedade de espécies de peixes marinhos nos oceanos Atlântico Norte e Pacífico Norte. Um pequeno número de casos também tem sido descrito em criatórios de peixes no Japão. Ao longo do século 20, o SVCV foi descrito somente em peixes ciprinídeos, como carpas cultivadas (*Cyprinus carpio*) na Europa, Ásia e em vários outros países da Europa Oriental. Em 2002, o primeiro diagnóstico confirmado de infecção pelo SVCV na América do Norte ocorreu em uma fazenda de peixes *koi*. Essa doença foi descrita posteriormente em vários estados dos EUA. O momento e a rota de introdução do SVCV na América do Norte não são conhecidos, porém é possível que tenha ocorrido pelo comércio de peixes ornamentais. A distribuição do HIRRV é restrita ao Japão, sendo descrito em peixes achatados, como o linguado-oliva (*Paralichthys olivaceus*) e o ayu (*Plecoglossus altivelis*).

– Ciclo natural de infecção

Os surtos de doenças pelos rabdovírus são mais graves em peixes jovens, e a maioria das espécies hospedeiras torna-se mais resistente à doença clínica com a idade. Porém, peixes maiores e inclusive adultos em desova podem ser infectados e atuar como carreadores do vírus. Os rabdovírus de peixes podem ser transmitidos horizontalmente entre peixes, pela água contaminada; e verticalmente, dos adultos para a prole, com o vírus associado às ovas. A importância relativa dessas duas vias de transmissão permanece obscura, mas acredita-se que a transmissão vertical seja rara, e que a transmissão horizontal pela água seja a principal forma de disseminação dos vírus.

Surtos de doença ocorrem com maior frequência em criatórios do que em peixes de vida livre, provavelmente pela densidade elevada, o que favorece uma maior eficiência de transmissão. No entanto, alguns surtos de infecção pelo IHNV, VHSV e SVCV têm sido descritos em populações de vida livre. Os peixes que sobrevivem à infecção podem ser carreadores do vírus por longos períodos ou erradicar o agente do organismo. Para o VHSV, a existência de um grande número de reservatórios (peixes marinhos), tem sido documentada, porém, até então, não foram descritos possíveis reservatórios e vetores para os outros rabdovírus de peixes.

A temperatura é um importante fator para a ocorrência de surtos. Os surtos da infecção pelo SVCV possuem sazonalidade, ocorrendo geralmente quando a temperatura da água atinge entre 10 e 16°C na primavera, não ocorrendo em temperaturas acima de 18°C. As epidemias causadas pelo IHNV e pelo VHSV ocorrem em temperaturas mais frias, entre 10 e 12°C, não ocorrendo acima de 15°C. Partículas víricas livres na água podem persistir viáveis por dias a semanas, com maior viabilidade sob temperaturas baixas e alta salinidade.

– Epidemiologia molecular

Variações entre isolados dos rabdovírus de peixes têm sido caracterizadas com base no per-

fil das proteínas virais, reações sorológicas com anticorpos monoclonais e policlonais e por tipificação genética. A análise filogenética e tipificação genética parcial das sequências dos genes G e N do IHNV, VHSV e SVCV permitiu a definição de genogrupos distintos dentro de cada espécie. Em concordância com estudos anteriores, essas análises demonstram que a relação entre os isolados é correlacionada com a origem geográfica. O IHNV possui três genogrupos, cada um com uma distribuição geográfica diferente na Costa Oeste dos EUA. Esses genogrupos possuem, ainda, alguma correlação com a espécie hospedeira entre os salmonídeos. O VHSV possui três genogrupos principais na Europa e um quarto na América do Norte, existindo alguma correlação entre os genogrupos e a origem marinha ou de água doce dos seus hospedeiros. Tanto o IHNV quanto o VHSV demonstram evidências de evolução viral específica dentro da piscicultura intensiva.

A análise de vários isolados de SVCV permitiu a formação de quatro subgrupos, e a análise conjunta com outros rabdovírus de peixes semelhantes aos vesiculovírus demonstrou a existência de três outros subgrupos, correlacionados com a localização geográfica e a espécie hospedeira. Para cada uma dessas espécies de vírus, a alta resolução conferida pelo sequenciamento de genes permitiu a criação de marcadores genéticos, que podem ser utilizados para a investigação de trajetórias migratórias, a fonte do vírus em surtos e o seu padrão de evolução ao longo do tempo.

5.3.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia

As doenças causadas pelos rabdovírus de peixes são caracterizadas por septicemia hemorrágica aguda, com degeneração tecidual e necrose em vários órgãos. O vírus penetra no peixe pelas brânquias, pele ou cavidade oral, replica de forma transitória nas células endoteliais e atinge a circulação sanguínea, disseminando-se pelo organismo. Exames histopatológicos demonstram lesões extensivas e necrose em órgãos hematopoiéticos, incluindo os rins, o fígado, baço e, com menor frequência, o coração. A necrose dos rins produz insuficiência, perda da regulação osmóti-

ca e freqüentemente morte. Durante a infecção, o vírus é excretado pela urina e pelo material fecal na água circundante. Além disso, o VHSV pode ser também excretado por úlceras de pele.

Os sinais clínicos da doença aguda podem incluir o escurecimento da pele, exoftalmia, petéquias na pele da base das nadadeiras, edema abdominal e fezes mucóides de coloração clara. Porém, muitos peixes morrem sem a apresentação de sinais externos visíveis e, por isso, freqüentemente, a primeira indicação de uma epidemia é o aumento súbito na mortalidade de peixes. Os sinais internos incluem anemia, edema, hemorragias petequiais disseminadas nos órgãos, no tecido adiposo e na musculatura. Os peixes infectados podem apresentar letargia e anorexia, comportamento natatório anormal e incapacidade de manter a posição vertical do seu eixo menor. A forma aguda da doença é observada com maior freqüência em filhotes (alevinos); os peixes maiores podem apresentar a infecção crônica sem sinais aparentes ou mortalidade. A infecção pelo IHNV e pelo VHSV apresenta ainda uma forma nervosa, quando a infecção atinge o encéfalo e causa um comportamento errático hiperativo.

Em infecções experimentais, a mortalidade inicia aproximadamente cinco a sete dias após a exposição à água contaminada, persistindo por três a quatro semanas. A ocorrência, duração e severidade dos surtos de doença dependem da combinação de fatores virais, do hospedeiro e do ambiente, incluindo a temperatura, a idade e o tamanho dos peixes, a densidade e o nível de estresse. As infecções por rhabdovírus podem predispor os peixes a infecções bacterianas secundárias, que podem contribuir para a morbidade e mortalidade.

5.3.4 Imunidade

A resposta imunológica dos peixes contra as infecções por rhabdovírus envolve mecanismos inespecíficos e, subsequente, a resposta imune adaptativa, com o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. Existem indicações ainda do envolvimento de resposta imune celular, no entanto, a função potencial de linfócitos citotóxicos não é conhecida. Isso se deve principalmente

à falta de anticorpos marcadores e linhagens celulares necessários para a investigação da imunidade celular. Após a exposição aos rhabdovírus, a primeira linha de defesa do organismo é a imunidade inata, envolvendo o interferon (IFN) e genes induzidos pelo IFN, análogos aos conhecidos em mamíferos. Sabe-se, desde os anos 1970, que a infecção pelo VHSV em peixes estimula a síntese de IFN, que apresenta um pico três dias após a infecção, e esse IFN possui uma ampla atividade antiviral. Os peixes possuem, ainda, outros componentes da imunidade inata, incluindo o complemento, receptores *toll* e genes induzidos por vírus que são específicos de peixes. Esses genes são induzidos rapidamente após a infecção viral ou vacinação. A secreção mucosa de peixes possui atividade antiviral natural, que pode ser evidenciada previamente à indução de anticorpos.

O desenvolvimento de níveis detectáveis de anticorpos séricos e de mucosas ocorre após três a dez semanas, e o pico ocorre em alguns meses. O tempo para o desenvolvimento é influenciado pela temperatura, com o desenvolvimento mais rápido em temperaturas mais altas. Os peixes geralmente possuem um subtipo principal de imunoglobulina e o soro contém mais anticorpos ligantes do que neutralizantes. A neutralização viral necessita de componentes do sistema complemento; anticorpos específicos para a glicoproteína G demonstraram ser necessários e suficientes para uma imunidade protetora.

A importância dos anticorpos neutralizantes para a imunidade contra os rhabdovírus de peixes tem sido demonstrada pela transferência passiva de soro de peixes convalescentes para peixes susceptíveis e soronegativos, conferindo imunidade frente ao desafio com doses letais de vírus. Peixes sobreviventes de epidemias de infecções por rhabdovírus desenvolvem imunidade protetora contra a exposição subsequente, possuindo títulos de anticorpos específicos que declinam lentamente com o tempo. A temperatura ambiental possui função importante na interação entre os rhabdovírus de peixes e os hospedeiros. A ocorrência de epidemias dessas infecções em temperaturas baixas se deve, em parte, à supressão da resposta imune, enquanto o contrário acontece em temperaturas mais elevadas, nas quais o sistema imune

é estimulado e a mesma infecção viral pode ser controlada pelo hospedeiro.

5.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico das infecções pelos rabdovírus de peixes deve iniciar com a coleta de amostras clínicas para os exames virológicos de rotina. Os tecidos para a coleta dependem do tamanho do peixe: para alevinos e peixes pequenos, coleta-se todo o animal, enquanto para peixes adultos, coleta-se os rins, baço e fluido reprodutivo, principalmente. Pode-se fazer um *pool* de amostras de até cinco peixes ou, ainda, examinar-se amostras individuais. Essas amostras devem ser transportadas a 4°C em gelo, não-congeladas, e devem ser processadas em 48 a 72 horas. Diluições de homogeneizados de tecidos, sêmen ou fluido ovariano são inoculadas em monocamadas de linhagens celulares susceptíveis, e o vírus é detectado pelo efeito citopático característico após dois a cinco dias, podendo levar duas semanas. O IHNV, o VHSV e o HIRRV são incubados a 15°C, e o SVCV é incubado entre 22 e 25°C.

O efeito citopático é característico de cada um dos vírus e resulta na formação de agregados em forma de cachos de uva por células arredondadas, formação de placas e, eventualmente, a destruição da monocamada. Após a detecção do efeito citopático, a identificação do agente pode ser realizada por neutralização com soro policlonal ou monoclonal específico. Esse método é confiável, sensível e preciso, porém é demorado, necessitando de duas a oito semanas para o diagnóstico final. Para a identificação rápida, métodos alternativos, como a IFA, PCR ou RT-PCR, têm sido utilizados. Outros métodos de detecção e identificação dos rabdovírus incluem testes sorológicos, como ELISA, immunoblots, imunohistoquímica (IHQ) e RT-PCR, em tecidos incluídos em parafina.

Para o IHNV, VHSV e SVCV, o exame de vários isolados por métodos sorológicos tem demonstrado que cada espécie é constituída por um sorotipo único, portanto, anticorpos policlonais podem detectar todos os isolados na maioria dos métodos. A detecção de anticorpos específicos no soro também pode ser útil como um indicativo de exposição prévia ao vírus. Técnicas para detecção

de anticorpos no soro incluem a neutralização viral (dependente de complemento) e ELISA.

5.3.6 Controle e profilaxia

Até o presente não existe tratamento para as infecções causadas pelos rabdovírus de peixes. A prevenção deve se basear na aplicação de medidas rígidas de biossegurança nos criatórios, evitando a introdução do agente. Essas medidas incluem o uso de ovas ou estoques de peixes certificados como livres de patógenos, e a criação de peixes jovens em água livre de contaminação por vírus, como água de poços, água tratada com luz ultravioleta, clorada/desclorada ou tratada com ozônio. Os rabdovírus de peixes são inativados por esses tratamentos e também por compostos contendo iodo (iodóforos) ou hipoclorito (alvejante). Soluções de iodóforos são utilizadas com frequência em fazendas de peixes e em incubatórios para desinfetar redes, equipamentos, botas, luvas e outros. A desinfecção de ovas de peixes com iodóforos (100 mg.Lt⁻¹) é efetiva, inativando aproximadamente 99,98% do IHNV. Portanto, a desinfecção de ovas com iodo é uma prática padrão e que, se aplicada de forma apropriada, apresenta sucesso na eliminação da transmissão vertical em estabelecimentos de cultura de peixes.

Outras práticas, tais como: evitar a mistura de ovas de várias fêmeas durante a postura e a distribuição de estoques de peixes em pequenas lagoas, não mantendo todos em uma mesma lagoa, são alternativas que evitam perdas em larga escala devido a epidemias. A seleção de peixes resistentes aos rabdovírus tem sido conduzida com algum progresso, demonstrando que existem bases genéticas de resistência à infecção. Finalmente, em escala global, o reconhecimento da disseminação acidental dos rabdovírus de peixes para outros continentes, no século passado, permitiu a aceitação de regulamentações internacionais, requerendo a inspeção sanitária dos peixes para prevenir o transporte de patógenos através de peixes cultivados. Porém o transporte de peixes ornamentais permanece sem regulamentação e representa uma importante fonte para a disseminação desses vírus.

Atualmente não existe nenhuma vacina comercial para uso em larga escala na prevenção da infecção pelos rhabdovírus de peixes. No entanto, o desenvolvimento de vacinas de DNA tem se demonstrado rápido e promissor. Vacinas tradicionais atenuadas ou inativadas têm sido testadas por décadas para esses vírus. Vacinas eficazes foram desenvolvidas, porém o seu uso foi limitado pelo custo, eficácia inconsistente ou pela incerteza quanto à segurança.

Com a aplicação da biologia molecular, vacinas de subunidades protéicas e de peptídeos foram desenvolvidas, mas a eficácia foi inconsistente, impedindo a comercialização em larga escala. Em 1995, a primeira descrição de uma vacina de DNA, expressando a glicoproteína G do IHNV, abriu novas perspectivas para a vacinologia de vírus de peixes. Desde então, vacinas de DNA contra o IHNV, o VHSV e o HIRRV têm demonstrado ser excepcionalmente eficazes, garantindo proteção de 80 a 100% dos peixes contra o desafio com doses letais sob várias condições ambientais. Essas vacinas consistem de plasmídeos, moléculas simples de DNA circular, que contêm somente um gene viral, portanto, são seguras e estáveis, além de eficazes. Uma vacina de DNA contra o IHNV foi licenciada, em 2005, no Canadá, e outros países devem liberar o comércio à medida que esta vacina encontre maior aceitação. Limitações atuais à aplicação dessas vacinas na aquicultura são os requerimentos regulatórios de licenciamento e a necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficientes de introdução do DNA nos animais. Além das vacinas de DNA, tem ressurgido o interesse em melhoria das vacinas inativadas.

6 Bibliografia consultada

- AFS. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Alpharetta, GA: Fish Health Section, American Fisheries Society, 2005.
- AHNE, W. et al. Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, v.52, p.261-272, 2002.
- AMENGUAL, B. et al. Evolution of European bat lyssavirus. *The Journal of General Virology*, v.78, p.2319-2328, 1997.
- BAER, G.M. (ed). The natural history of rabies. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. 620p.
- BAER, G.M. Rabies in Nonhematophagous bats In: _____. *The natural history of rabies*. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1975. p.79-97.
- BALL, L.A.; WHITE, C.N. Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.73, p.442-446, 1976.
- BETTS, A.M. et al. Emerging vesiculo-type virus infections of freshwater fish in Europe. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.57, p.201-212, 2003.
- BINGHAM, J. Canine Rabies Ecology in Southern Africa. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p.1337-1342, 2005.
- BOOTLAND, L.M.; LEONG, J.C. Infectious hematopoietic necrosis virus. In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. (eds). *Fish diseases and disorders: Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections*. New York: CAB International, 1999. p.57-121.
- BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Taxonomy and evolutionary studies on lyssaviruses with special reference to Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.60, p.277-282, 1993.
- CHARLTON, K.M. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. In: RUPPRECHT, C.E.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. (eds). *Lyssaviruses*. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.95-119.
- CUNHA, E.M. et al. Isolation of rabies virus in *Artibeus fimbriatus* bat in State of São Paulo, *Revista de Saúde Pública*, v.39, p.683-684, 2005.
- EINER-JENSEN, K. et al. Evolution of the fish rhabdovirus viral hemorrhagic septicaemia virus. *The Journal of General Virology*, v.85, p.1167-1179, 2004.
- FAUQUET, C.M. et al. (eds). *Virus Taxonomy VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Academic Press, 2005. 1162p.
- FAUQUET, C.M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*, v.2, p.64, 2005.
- FEDERER, K.E.; BURROWS, R.; BROOKSBY, J.B. Vesicular stomatitis virus--the relationship between some strains of the Indiana serotype. *Research in Veterinary Science*, v.8, p.103-117, 1967.
- FRASER, G.C. et al. Encephalitis caused by a lyssavirus in fruit bats in Australia. *Emerging Infectious Diseases*, v.2, p.327-330, 1996.
- GONÇALVES, M.A.S.; NETO, R.S.; BRAZIL, T. K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, p.461-464, 2002.

- HELLENBRAND, W. et al. Cases of rabies in Germany following organ transplantation. **Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles**, v.10, E050224.6, 2005.
- JOHNSON, N.; PHILLPOTTS, R.; FOOKS, A.R. Airbone transmission of lyssavirus. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.785-790, 2006.
- KIM, D.H. et al. Complete nucleotide sequence of the hiram rhabdovirus, a pathogen of marine fish. **Virus Research**, v.107, p.1-9, 2005.
- KING, A.A.; TURNER, G.S.; Rabies, A review. **Journal of Comparative Pathology**, v.108, p.1-39, 1993.
- KOPROWISKI, H. (Ed). **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.200-207.
- KURATH, G. et al. Phylogeography of infectious hematopoietic necrosis virus in North America. **The Journal of General Virology**, v.84, p.803-814, 2003.
- KURATH, G. Overview of recent DNA vaccine development for fish. **Developments in Biologicals**, v.121, p.201-213, 2005.
- KURATH, G.; HIGMAN, K.H.; BJORKLUND, H.V. Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses. Anonymous. **The Journal of General Virology**, v.78, p.113-117, 1997.
- LEONG, J.C.; FRYER, J.L. Viral vaccines for aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v.3, p.225-240, 1993.
- LUMLERTDACHA, B. et al. Bat Nipah Virus, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1949-1951, 2005.
- McWILLIAM, S.M. et al. Genome organization and transcription strategy in the complex GNS-L intergenic region of bovine ephemeral fever rhabdovirus. **The Journal of General Virology**, v.78, p.1309-1317, 1997.
- MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.
- OIE. **Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2006**. Paris, France: OIE, 2006. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm. Acesso em: 18 nov. 2006.
- RAO, B.L. et al. A large outbreak of acute encephalitis with high fatality rate in children in Andhra Pradesh, India, in 2003, associated with Chandipura virus. **Lancet**, v.364, p.869-874, 2004.
- RODRIGUEZ, L.L. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. **Virus Research**, v.85, p.211-219, 2002.
- RODRIGUEZ, L.L. et al. Full-length genome analysis of natural isolates of vesicular stomatitis virus (Indiana 1 serotype) from North, Central and South America. **The Journal of General Virology**, v.83, p.2475-2483, 2002.
- ROSE, J.K.; WHITT, M.A. Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.38, p.1241-1244.
- SCHAEFER, R. et al. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v.107, p.161-170, 2005.
- SMAIL, D.A. Viral haemorrhagic septicaemia In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. (eds). **Fish diseases and disorders: Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections**. New York: CAB International, 1999. p.123-147.
- SNOW, M. et al. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.61, p.11-21, 2004.
- SPIROPOULOU, C.F.; NICHOL, S.T. A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus. **Journal of Virology**, v.67, p.3103-3110, 1993.
- STONE, D.M. et al. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp viruses and pike fry rhabdovirus isolates reveals four distinct piscine vesiculovirus genogroups. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.53, p.203-210, 2002.
- WAGNER, R.R.; ROSE, J.K. Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.37, p.1121-1135.
- WANDELER, A.I. et al. Rabies epidemiology: some ecological and evolutionary perspectives. In: RUPPRECHT, C.E.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. (eds). **Lyssaviruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.297-324.
- WOLF, K. **Fish viruses and fish viral diseases**. Ithaca: Cornell University Press, 1988. 476p.

ORTHOMYXOVIRIDAE

Eduardo Furtado Flores, Luciane T. Lovato,
Mariana Sá e Silva, Renata Dezengrini & Diego G. Diel

28

1 Introdução	723
2 Classificação	724
3 Estrutura dos vírions	725
3.1 Propriedades gerais	725
3.2 O envelope	725
3.2.1 O genoma	725
3.3 Os nucleocapídeos	727
3.3.1 O genoma	727
4 Replicação	728
4.1 Adsorção e penetração	729
4.2 Transcrição	729
4.3 Replicação do genoma	731
4.4 Morfogênese e egresso	731
5 Genética dos vírus da influenza	733
6 Infecções de importância em veterinária causadas por ortomixovírus	735
6.1 Influenza eqüina	735
6.1.1 Epidemiologia	735
6.1.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos	736
6.1.3 Imunidade	737
6.1.4 Diagnóstico	737
6.1.5 Profilaxia e controle	738
6.2 Influenza suína	738
6.2.1 Características do vírus	739
6.2.2 Epidemiologia	739
6.2.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia	740
6.2.4 Imunidade	741
6.2.5 Diagnóstico	741
6.2.6 Profilaxia e controle	742

6.3 Influenza aviária	742
6.3.1 Características do vírus	742
6.3.2 Epidemiologia	743
6.3.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia	744
6.3.4 Imunidade	744
6.3.5 Diagnóstico	745
6.3.6 Controle e profilaxia	746
 6.4 Influenza em aves silvestres	 748
6.5 Vírus da influenza H5N1	749
 6.6 Influenza em cães, felinos e outros mamíferos	 750
6.6.1 Epidemiologia	751
6.6.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	751
6.6.3 Diagnóstico	752
6.6.4 Controle e prevenção	752
 7 Bibliografia consultada	 753

1 Introdução

A família *Orthomyxoviridae* abriga importantes patógenos humanos e animais, associados essencialmente com infecções respiratórias. A denominação da família deriva do latim e reflete uma importante característica biológica desses vírus, pois *myxo* significa muco, e *ortho* significa verdadeiro. Ou seja, são os verdadeiros vírus do muco, em uma referência à sua propriedade de penetrar através do muco e infectar células do epitélio respiratório. Essa denominação foi utilizada para diferenciá-los de outra família de vírus associados com infecções respiratórias, a *Paramyxoviridae*. Essas famílias compartilham algumas propriedades biológicas, mas são diferentes do ponto de vista estrutural e genético.

Os ortomixovírus causam as infecções respiratórias de pessoas e animais conhecidas como gripe ou influenza. Assim, são conhecidos como vírus da influenza ou vírus da gripe. A influenza é a principal doença respiratória humana e um dos principais problemas de saúde pública no mundo inteiro, além de ser uma importante causa de perdas econômicas em animais de produção. Historicamente os vírus da influenza têm sido envolvidos em epidemias de grandes proporções que ceifaram a vida de milhões de pessoas. Pela sua constante evolução genética e antigênica, esses vírus são considerados uma das principais ameaças à saúde pública mundial.

Os vírions dos ortomixovírus são grandes, pleomórficos, com envelope e contêm sete ou oito moléculas de RNA de polaridade negativa como genoma. A natureza segmentada do genoma proporciona condições para a ocorrência de recombinações do tipo ressortimento. Nesses eventos, ocorre a redistribuição de segmentos genômicos entre duas cepas virais originando outro vírus, com genótipo e fenótipo mistos. Esse mecanismo genético permite aos vírus da influenza evoluir rapidamente, e tem sido responsabilizado pelo surgimento de cepas altamente virulentas associadas com doença severa e alta mortalidade, principalmente em humanos.

Outra característica marcante dos vírus da influenza é a alta variabilidade antigênica das glicoproteínas de superfície. Essa variabilidade per-

mite ao vírus persistir indefinidamente na população, através de mutações e seleção de variantes, que não são neutralizadas pelos anticorpos produzidos pelo hospedeiro. A grande variabilidade antigênica, principalmente dos vírus humanos, constitui-se em um obstáculo quase intransponível para a produção de vacinas permanentes e de uso universal.

Os hospedeiros naturais dos vírus da influenza são aves aquáticas e migratórias de várias espécies. Nesses animais, o vírus replica no intestino sem produzir sinais clínicos e é excretado em altos títulos nas fezes. Curiosamente, o vírus se mantém muito estável geneticamente nesses hospedeiros, provavelmente por ausência de pressão imunológica seletiva. No entanto, a ocorrência ocasional de ressortimento de segmentos genômicos entre cepas diferentes – ou de outras mutações – pode resultar em alterações marcantes no fenótipo viral, com o surgimento de variantes capazes de infectar humanos e outros mamíferos. Após a sua transferência para novos hospedeiros, esses vírus geralmente apresentam uma rápida evolução genética através de mutações. Esses variantes podem também apresentar virulência aumentada para os seus hospedeiros naturais e para aves domésticas.

Acredita-se que os vírus da influenza que infectam humanos e animais domésticos provavelmente se originaram de ancestrais oriundos de aves aquáticas e migratórias, em um passado recente ou remoto. Ou seja, os vírus da gripe são potencialmente zoonóticos, ao contrário do que era historicamente considerado. Por essa razão, considera-se que as aves aquáticas se constituem em um imenso reservatório de vírus da influenza, podendo transmiti-los a pessoas, mamíferos e aves domésticas. Um exemplo recente foi o surgimento de variantes aviárias do genótipo H5N1 altamente patogênicas para humanos e para outros mamíferos. Outro exemplo da habilidade desses vírus de cruzar a barreira de espécies é o vírus H3N8, que foi transmitido de equinos para cães, nos quais produz doença severa.

Após a adaptação aos seus novos hospedeiros, os vírus se tornam relativamente espécie-específicos e apresentam uma capacidade restrita de infectar espécies heterólogas. Essa barreira in-

terespécies, no entanto, parece ser tênue e temporária, e os vírus podem, ocasionalmente, evoluir e se tornar capazes de cruzar a barreira de espécies e infectar outros hospedeiros. Esses exemplos ilustram a contínua evolução desses agentes, o que torna a sua biologia e epidemiologia fascinantes, ao mesmo tempo em que impõe barreiras enormes para o seu controle.

Este capítulo abordará as características gerais da família e os vírus de interesse veterinário. Grande parte dos conhecimentos adquiridos sobre essa família foi obtida de estudos com os vírus da influenza A humana. Por isso, a parte geral deste capítulo utilizará informações obtidas a partir desses estudos. Ao final do capítulo, será abordada, resumidamente, a infecção pelo vírus H5N1, que adquiriu virulência mesmo para as aves e, ocasionalmente, é transmitido para pessoas, quando causa doença severa e frequentemente fatal. A possibilidade da disseminação desse vírus na população humana representa um risco real para a saúde pública mundial.

2 Classificação

De acordo com o ICTV (Comitê Internacional para a Taxonomia de Vírus), a família *Orthomyxoviridae* é dividida em quatro gêneros:

- Influenza A: abriga vírus que infectam uma variedade de espécies de aves, de mamíferos e humanos. São os principais componentes desta família, pela sua distribuição e importância sanitária. Possuem oito segmentos genômicos e duas glicoproteínas principais de superfície: HA (hemaglutinina) e NA (neuraminidase). Essas glicoproteínas apresentam uma notável variabilidade antigênica;

- Influenza B: vírus que infectam apenas humanos. Também possuem oito segmentos genômicos e duas glicoproteínas principais (HA e NA). Essas glicoproteínas, no entanto, apresentam pouca variabilidade antigênica quando comparadas com o gênero anterior;

- Influenza C: abriga vírus que tradicionalmente só eram identificados em humanos, porém a infecção natural já foi demonstrada também em suínos. Esses vírus raramente estão associados com doença nos seus hospedeiros. Possuem sete

segmentos genômicos e apenas uma glicoproteína multifuncional no envelope (HEF);

- *Thogotovirus*: abrange vírus encontrados em carrapatos, sem envolvimento com doença em vertebrados até o presente.

Os vírus dos gêneros A, B e C podem ser diferenciados entre si de acordo com as propriedades antigênicas das proteínas do nucleocapsídeo (NP) e da matriz (M1). Os vírus da influenza A apresentam uma grande variabilidade antigênica e podem ser classificados em subtipos de acordo com a reatividade sorológica das glicoproteínas HA e NA.

Até o presente, já foram identificados 16 diferentes tipos de HA e nove tipos de NA, que permitem a formação de centenas de possíveis subtipos H/N. No entanto, apenas alguns subtipos já foram reconhecidos como patogênicos para cada espécie. Dentre esses, destacam-se os tipos H1N1, H2N2 e H3N2 em humanos; H7N7 e H3N8 em equinos; H1N1 e H3N2 em suínos. As aves aquáticas abrigam um repertório inumerável de possíveis combinações H/N. Os subtipos H5N2 e H7N1 são os principais vírus encontrados nos surtos de doença em aves domésticas. Recentemente, alguns vírus do subtipo aviário H5N1 se tornaram virulentos, inclusive para algumas espécies de aves silvestres. Esses vírus foram transmitidos para aves domésticas e para humanos, causando centenas de mortes, principalmente na Ásia. Esse vírus também foi transmitido para outros animais domésticos, como felinos. Vírus aviários dos subtipos H9N2 (China e Hong Kong, 1999) e H7N7 (Holanda, 2003) também foram recentemente transmitidos para humanos e aves domésticas, porém com consequências menos graves.

A nomenclatura dos isolados e cepas dos vírus da influenza segue um padrão universal, considerando o tipo de vírus (A, B e C), hospedeiro de origem (quando não for de humanos), origem geográfica, número da cepa, ano de isolamento e o subtipo da HA e NA (entre parênteses). Exemplos: influenzavírus A/Hong Kong/1/68 (H3N2) – vírus isolado de humanos durante a pandemia de 1968; ou influenzavírus suíno A/swine/Iowa/15/30 (H1N1) – cepa de referência do vírus da influenza suína.

3 Estrutura dos vírions

3.1 Propriedades gerais

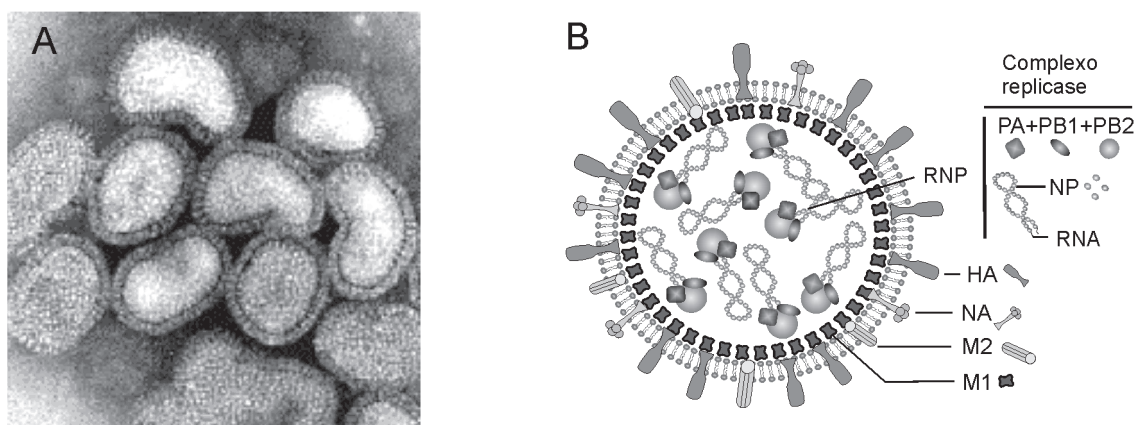
Os ortomixovírus apresentam vírions grandes, envelopados e pleomórficos. As partículas víricas podem apresentar formas esféricas com contorno pouco regular (80-120 nm de diâmetro), formas filamentosas (20-50 x 200-300 nm) ou forma de rim (Figura 28.1). Os vírions obtidos após múltiplas passagens em ovos embrionados ou em cultivo celular apresentam uma morfologia mais homogênea e medem entre 80 e 120 nm; enquanto os isolados recentes apresentam um polimorfismo marcante. Os vírions são sensíveis a temperaturas elevadas, apresentando curta viabilidade em condições ambientais. A infectividade é inativada em 30 minutos a 56°C ou sob pH 3; e são sensíveis a solventes lipídicos (éter/clorofórmio) e detergentes.

3.2 O envelope

O envelope lipídico apresenta aproximadamente 500 projeções (espículas) de 10 a 14 nm, formadas pelas glicoproteínas HA e NA. As projeções são formadas por homotrímeros da HA e homotetrâmeros da NA, na proporção de 4:1 ou 5:1. As projeções formadas pela HA são mais longas do que as formadas pela NA, que apresentam

uma aparência de cogumelo. As glicoproteínas HA e NA são típicas proteínas integrais de membrana, apresentando uma região externa grande, uma região transmembrana hidrofóbica e uma pequena cauda interna. A orientação dessas glicoproteínas, no entanto, é inversa: a HA apresenta a extremidade amino orientada para o exterior, enquanto a NA possui essa extremidade orientada para o interior do vírion. Outro componente do envelope é a proteína com atividade de canal de íons (M2), que está presente em um número pequeno de cópias (Figura 28.1).

A HA é uma proteína multifuncional, responsável pela ligação dos vírions aos receptores celulares (ácido siálico) e pela fusão do envelope com a membrana endossomal, permitindo a penetração dos nucleocapsídeos no citoplasma. Possui, ainda, a propriedade de aglutinar eritrócitos de animais (atividade hemaglutinante) e contém os principais epitopos que são alvos de anticorpos neutralizantes. Essa variabilidade antigênica, juntamente com a variação observada na NA, é responsável pela habilidade do vírus persistir na população apesar da resposta imunológica montada pelos hospedeiros. A variabilidade antigênica da HA é também utilizada para classificar os isolados de campo em subtipos, ou seja, os subtipos são definidos de acordo com a reatividade da sua HA com anti-soro específico de cada subtipo.



Fonte: A) Dr. C. Büchen-Osmond, ICTVdB.

Figura 28.1. Partículas do vírus da influenza A. A) Fotografia de microscopia eletrônica de vírions; B) Ilustração esquemática da estrutura da partícula vírica e seus componentes. HA) hemaglutinina; NA) neuraminidase; NP) nucleoproteína; M1) proteína da matriz; M2) proteína com atividade de canal de íons; PA) polimerase ácida; PB1) polimerase básica 1; PB2) polimerase básica 2; RNP) ribonucleoproteína.

A HA é sintetizada como um polipeptídeo único (HA0), que é clivado durante o transporte das glicoproteínas para a membrana plasmática no final do ciclo replicativo. Essa clivagem, que é essencial para a infectividade dos vírions, origina dois polipeptídeos (HA1 e HA2), que permanecem unidos por pontes dissulfeto, formando a proteína funcional HA. Nessa molécula, a HA1 abrange a região globular externa, que possui os sítios de ligação aos receptores e os principais epitopos alvos de anticorpos neutralizantes (Figura 28.2). As variações nesses epitopos são as responsáveis pela grande variabilidade antigênica do vírus da influenza A. A HA2 possui a forma de haste e localiza-se logo abaixo da HA1. Esse polipeptídeo apresenta uma região transmembrana e uma região intermediária, que contém o peptídeo fusogênico. Esse peptídeo é responsável pela fusão do envelope com a membrana celular. A fusão do envelope viral com a membrana do endossomo se constitui em uma etapa essencial para a penetração do vírus na célula e é precedida por alterações conformacionais drásticas na HA, induzidas pelo pH baixo nos endossomos.

A NA se organiza em tetrâmeros e está presente no envelope em menor abundância do que a HA. A neuraminidase se constitui na segunda proteína responsável pela classificação do vírus em subtipos. Essa proteína também possui uma região alongada (haste), cuja extremidade está associada com a membrana, e uma região globular que é responsável pela sua atividade biológica (Figura 28.2). A NA é responsável pela clivagem do ácido siálico das glicoproteínas celulares, mas o significado biológico dessa atividade no ciclo replicativo do vírus ainda não é bem conhecido. Essa atividade poderia facilitar a penetração dos vírions através da camada de muco presente sobre a mucosa respiratória até alcançar o epitélio. Também tem sido sugerido que essa atividade é importante para a liberação dos vírions da superfície celular durante o egresso, sem a qual os vírions ficariam agregados na membrana. A NA também contém determinantes antigênicos sujeitos a variações frequentes, o que contribui para a variabilidade antigênica desses vírus.

A M2 é uma proteína integral de membrana presente em poucas cópias no envelope viral.

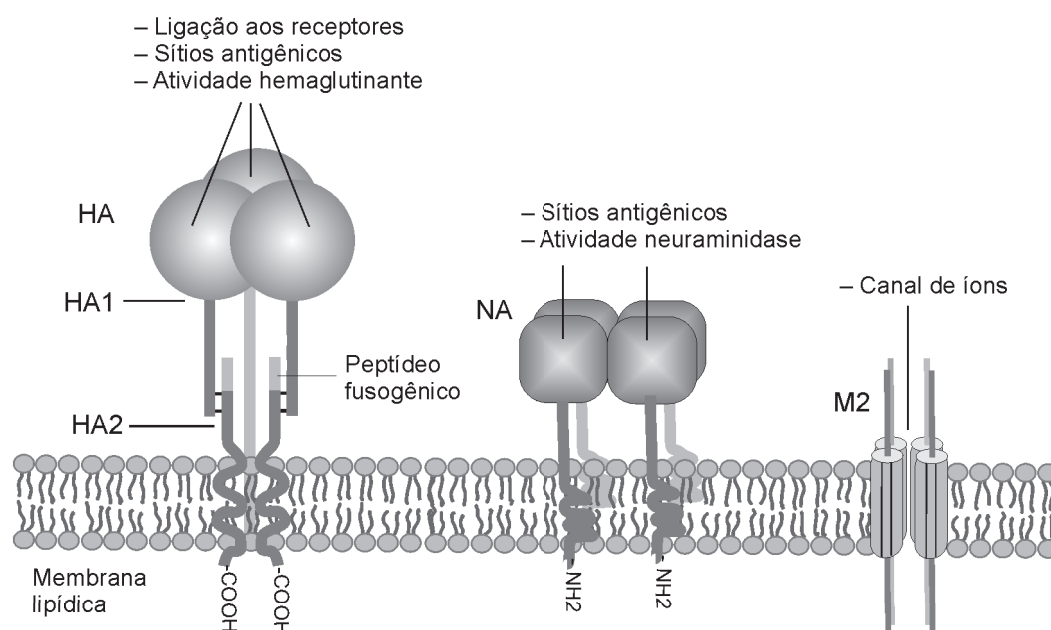


Figura 28.2. Ilustração esquemática da estrutura das glicoproteínas HA, NA e M2 dos vírus da influenza, com indicação dos componentes biologicamente relevantes.

Essa proteína está presente em arranjos tetraméricos que ultrapassam toda a espessura da membrana, formando uma espécie de canal que permite a comunicação entre os compartimentos interno e externo (Figura 28.2). De fato, a M2 funciona como um canal de íons que possui um papel importante em duas etapas distintas do ciclo, durante a penetração e, posteriormente, durante a maturação dos vírions. A primeira função é exercida durante a internalização dos vírions, no interior de endossomos acidificados. A estrutura da M2 se abre e permite a penetração de íons H⁺ para o interior dos vírions. A acidificação interna do pH favorece a dissociação dos ribonucleocapsídeos da proteína da matriz, facilitando, assim, o desnudamento. A segunda atividade da M2 ocorre na fase final do ciclo, durante o transporte das glicoproteínas em vesículas do aparelho de Golgi para a membrana plasmática, onde ocorrerá o brotamento dos nucleocapsídeos. Nessa etapa, o canal formado pela M2 (que está inserida na membrana das vesículas) se abre e permite a saída de íons H⁺ das vesículas para o citoplasma. Assim, o pH no interior dessas vesículas se mantém alto, prevenindo a ocorrência prematura das alterações conformacionais da HA.

A M1 é o componente mais abundante dos vírions, apresentando aproximadamente 3.000 cópias por vírion. A camada formada por essa proteína está intimamente associada com a face interna do envelope e medeia as interações entre o envelope e os nucleocapsídeos. A M1 desempenha um papel estrutural importante, conferindo certa rigidez à estrutura dos vírions e também é importante durante o processo de morfogênese.

3.3 Os nucleocapsídeos

No interior dos vírions, são encontrados oito nucleocapsídeos, que se apresentam como bastões helicoidais flexíveis, provavelmente flexionados e enrolados sobre si mesmos (ver Figura 28.1). Cada nucleocapsídeo contém um segmento de RNA conjugado com múltiplas cópias da proteína NP (uma molécula da NP para cada 20 nucleotídeos, nt). O complexo RNA + NP é denominado ribonucleoproteína (RNP) e é relativamente estável, permanecendo razoavelmente associado durante os processos de transcrição e replicação do genoma. Associadas às RNPs encontram-se três proteínas menos abundantes (30-60 cópias por vírion), que são componentes do complexo polimerase (transcriptase/replicase). Esse complexo é formado por três proteínas principais: PB1 (polimerase básica 1); PB2 (polimerase básica 2) e PA (polimerase ácida).

3.3.1 O genoma


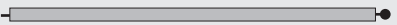

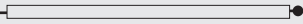

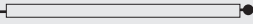
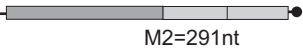
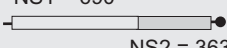
O genoma dos vírus da influenza A é constituído por oito moléculas lineares de RNA de sentido negativo, numerados de 1 a 8. Os segmentos 1 a 6 codificam uma proteína cada; os segmentos 7 e 8 codificam duas proteínas cada. Os segmentos genômicos apresentam a mesma organização geral: possuem um gene na região central, flanqueado por seqüências não-codificantes altamente conservadas nas extremidades 3' (12 nt) e 5' (13 nt) (Figura 28.3). Essas seqüências são parcialmente complementares e permitem a formação das estruturas que lembram cabos de panela (*pa-*

RNA genômico (-)



Figura 28.3. Organização dos segmentos de RNA que compõem o genoma dos vírus da influenza A (família Orthomyxoviridae).

Tabela 28.1. Organização do genoma e produtos codificados pelo vírus da influenza A (família *Orthomyxoviridae*).

Segmento	Gene (ORF)	Proteína/função
1	PB2 = 2277nt 	Polimerase básica 2 – componente do complexo replicase. Reconhece e cliva oligonucleotídeos de mRNA celulares.
2	PB1 = 2271nt 	Polimerase básica 1 – componente do complexo replicase. Possui atividade de polimerase. É a replicase viral.
3	PA = 2148nt 	Polimerase ácida – componente do complexo replicase. Função desconhecida.
4	HA = 1698nt 	Hemaglutinina – principal glicoproteína do envelope. Media a ligação aos receptores e fusão/penetração. Altamente variável.
5	NP = 1494nt 	Nucleoproteína – conjugada com o genoma, forma o nucleocapsídeo. Muito abundante.
6	NA = 1362nt 	Neuraminidase – glicoproteína do envelope. Cliva a ligação com o ácido siálico.
7	M1=756nt ?=27  M2=291nt	M1 – proteína da matriz. Proteína mais abundante dos vírions. Media a interação entre o envelope e os nucleocapsídeos. Participa da morfogênese. M2 – proteína integral do envelope. Canal de íons. Essencial para o desnudamento.
8	NS1 = 690  NS2 = 363nt	NS1 – proteína não-estrutural. Inibe o <i>splicing</i> de mRNA celulares. NS2 – proteína não-estrutural. Interage com a M1. Envolvida com a exportação de RNPs do núcleo.

nhandles) durante a transcrição e replicação. As regiões terminais também possuem sinais para o início da transcrição e replicação. Cada segmento genômico encontra-se recoberto por múltiplas cópias da proteína NP e está associado com algumas cópias das proteínas que formam o complexo transcriptase/replicase.

Os segmentos genômicos dos vírus da influenza, com os respectivos genes e as prováveis funções de seus produtos, estão apresentados na Tabela 28.1.

4 Replicação

Os ortomixovírus se constituem em exceções entre os vírus RNA, pois a replicação do ge-

noma ocorre no núcleo da célula hospedeira. Os nucleocapsídeos contêm as enzimas necessárias para a transcrição e replicação do genoma (complexo polimerase PA+PB1+PB2). No entanto, o vírus necessita subtrair componentes celulares (oligonucleotídeos com *cap*) para a produção de seus RNA mensageiros (mRNA). Durante o ciclo, as proteínas não-estruturais (PA+PB1+PB2) e algumas estruturais (NP, M1), produzidas no citoplasma, são importadas para o núcleo, onde participam de ciclos adicionais de transcrição e replicação e, tardiamente, participam da formação dos nucleocapsídeos.

Os vírus da influenza se multiplicam com eficiência em embriões de galinha e podem ser adaptados a replicar em fibroblastos de pinto e

em linhagens celulares de mamíferos (p. ex.: células MDCK, de origem canina). A replicação em cultivo celular, principalmente de isolados recentes, pode não produzir efeito citopático evidente. Assim, o vírus pode ser detectado e quantificado no sobrenadante dos cultivos (ou no líquido amniótico dos ovos embrionados) pela técnica de hemaglutinação (HA); e pode ser identificado/tipificado por inibição de hemaglutinação (HI) com um soro tipo – ou subtipo – específico.

4.1 Adsorção e penetração

Os vírus da influenza utilizam moléculas de ácido siálico (AS) como receptores. Essas moléculas estão presentes em uma variedade de glicoproteínas e glicolipídios de membrana. A ligação dos vírions a estes componentes é mediada pela glicoproteína HA. A ligação química que mantém o AS associado às glicoproteínas pode ser de dois tipos principais: $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$. O tipo de ligação do AS é responsável pela especificidade de espécie e de tropismo tecidual dos vírus da influenza. A HA de alguns vírus somente é capaz de se ligar ao AS na ligação $\alpha 2,3$, enquanto outros se ligam a moléculas com a conformação $\alpha 2,6$. A traquéia humana contém AS predominantemente com ligação do tipo $\alpha 2,6$, enquanto o intestino das aves contém ligações do tipo $\alpha 2,3$. Já o trato respiratório dos suínos possui o AS com os dois tipos de ligação: $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$. A especificidade da HA por ligações $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ é um fator fundamental para a capacidade desses vírus infectar a sua espécie hospedeira e outras espécies. Assim, os vírus aviários que adquirem a capacidade de se ligar ao AS na conformação $\alpha 2,6$ podem infectar humanos. Já os suínos podem ser ocasionalmente infectados com vírus aviários e humanos, pois possuem o AS com os dois tipos de ligação.

A ligação de uma única molécula de HA a uma molécula de AS é de baixa afinidade e, assim, são requeridas múltiplas (dezenas ou centenas) interações simultâneas para permitir a adsorção e posterior penetração dos vírions.

Imediatamente após a adsorção, os vírions são internalizados por endocitose mediada por clatrina e se localizam em vesículas endocíticas que se dirigem para o interior do citoplasma.

Durante o trânsito, as vesículas são acidificadas gradativamente pela ação de ATPases, que bombeiam prótons H^+ para o seu interior. Através das aberturas mediadas pela M2, os prótons H^+ penetram também no interior dos vírions. A acidificação dos endossomos resulta em dois efeitos para a penetração do vírus. Primeiro: provoca alterações conformacionais na HA, que resultam na exposição do peptídeo fusogênico e fusão do envelope com a membrana endocítica. Segundo: o pH baixo no interior dos vírions facilita a dissociação entre as RNPs e a proteína M1, promovendo o desnudamento parcial e permitindo a liberação das RNPs no interior do citoplasma. A droga amantadina – utilizada como terapêutico antiviral – inibe a ação da M2, resultando em penetração e desnudamento ineficientes do vírus. Drogas que previnem a acidificação dos endossomos (monensina, cloroquina, cloreto de amônio) também previnem a penetração dos vírus da influenza em células de cultivo.

Uma vez dissociados da M1 e liberados no interior do citoplasma, as RNPs são transportadas para o núcleo, onde penetram ativamente pelos poros nucleares. As proteínas que compõem o complexo RNP contêm sinais de localização nuclear que promovem a sua importação para o núcleo celular.

4.2 Transcrição

A transcrição dos RNA genômicos é realizada pelo complexo transcriptase/replicase, que está associado com as RNPs, e cada proteína deste complexo desempenha funções diferentes. A PB1 possui atividade endonuclease, necessária para a subtração de oligonucleotídeos celulares que servem de *primers* para o início da transcrição. A PB2 possui atividade polimerase e se constitui na replicase viral, realizando as funções de transcrição e replicação do genoma. A função exata da PA não é conhecida, mas esta proteína é um componente essencial do complexo.

A transcrição se inicia logo após a penetração das RNPs no núcleo, e cada segmento genômico é transcrito individualmente, originando mRNA com *cap* e poliA. A transcrição é precedida pela clivagem e subtração de segmentos de mRNAs

celulares. Os oligonucleotídeos subtraídos correspondem aos primeiros 8 a 13 nt dos mRNA e possuem *cap* na extremidade 5'. Essa atividade é atribuída à PB1, que possui atividade endonuclease, ou seja, essa enzima literalmente furta segmentos de mRNAs celulares para benefício do vírus. Os oligonucleotídeos subtraídos pareiam com uma pequena sequência próxima a extremidade 3' do RNA genômico e servem de *primers* para o início da transcrição. Como resultado da polimerização a partir da extremidade 3' desses *primers*, os mRNA virais sintetizados possuem a estrutura *cap*, que é necessária para a sua tradução.

A transcrição termina 15 a 22 nt antes da extremidade 5' de cada segmento, e é seguida pela adição de uma cauda de poliA. Os mRNAs virais

não são, portanto, exatamente complementares aos RNAs genômicos: possuem uma extensão de 8 a 13 nt em sua região 5' e não possuem os 15-22 nt terminais, sendo substituídos por uma cauda poliA (Figura 28.4).

Os transcritos produzidos a partir dos segmentos 7 e 8 sofrem processamento por *splicing* e originam mRNAs que são traduzidos em mais de uma proteína. No segmento 7, são gerados três mRNAs: um codifica a proteína M1 (dois terços anteriores do mRNA), outro codifica a proteína M2 (terço final do gene) e um terceiro contém uma ORF de 27 nt cuja tradução é incerta. O segmento 8 origina um transcrito que resulta em dois mRNAs após o *splicing*: um codifica a proteína não-estrutural NS1 e o outro é traduzido na proteína NS2 (ver Tabela 28.1).

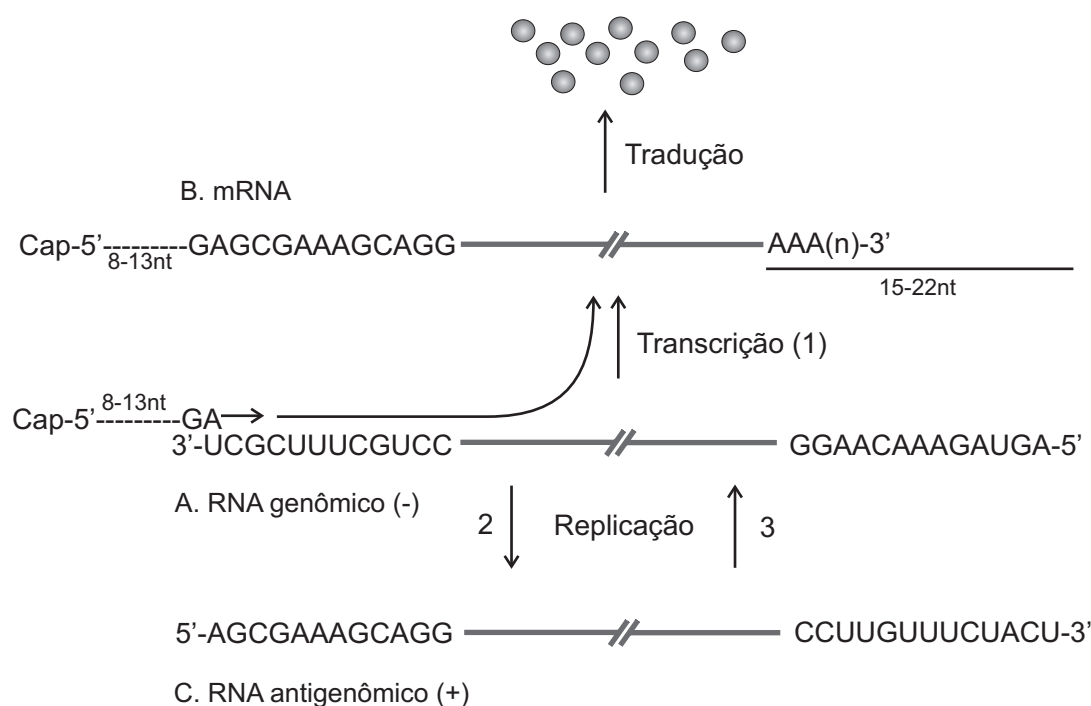


Figura 28.4. Estrutura dos RNAs produzidos durante a replicação do vírus da influenza. (A) RNA genômico (vRNA); (B) mRNA; (C) RNA antígeno. A transcrição para a síntese de mRNA utiliza nucleotídeos com cap subtraídos dos mRNA celulares (1). Os mRNA apresentam uma extensão de 8-13 nt (com cap) em relação ao vRNA e os 15-22 nucleotídeos terminais são substituídos por uma cauda poliA. A primeira etapa da replicação do genoma envolve a síntese do RNA de sentido antígeno que é exatamente complementar ao vRNA (2). A segunda etapa da replicação envolve a síntese do vRNA a partir do RNA antígeno (3). Note que os mRNAs diferem dos RNA antígenicos, pela presença de 8-13 nt adicionais com cap e cauda poliA.

4.3 Replicação do genoma

A replicação dos RNA genômicos (vRNA) ocorre em duas etapas: síntese do RNA antígenômico ou complementar e síntese de vRNA utilizando o RNA antígenômico como molde. A síntese do RNA antígenômico não envolve a subtração de oligonucleotídeos de mRNA celulares; inicia-se exatamente na extremidade 3' do genoma e termina exatamente na extremidade 5'. Dessa forma, os RNAs antígenômicos são exatamente complementares aos vRNAs (Figura 28.4).

Os dois tipos de transcrição observados durante a replicação desses vírus, ou seja, a transcrição dependente dos oligonucleotídeos com *cap* (para a produção de mRNA) e a transcrição independente de *primer* (para a produção de RNA antígenômico) parecem envolver complexos transcriptase/replicase diferentes. A antiterminação, que permite ao complexo transcriptase seguir transcrevendo até o final do segmento – e produzir a cópia antígenômica completa – parece ser dependente do acúmulo da proteína NP. Dessa forma, o acúmulo desta proteína e alterações específicas na composição do complexo polimerase seriam os responsáveis pela transição entre transcrição e replicação. Essa transição ocorre em fases avançadas do ciclo e culmina com a produção dos RNAs genômicos (também chamados de vRNAs) para serem incorporados nos vírions.

Em todas as etapas da replicação, os RNAs de sentido antígenômico e genômico são rapidamente conjugados com múltiplas cópias da proteína NP. As RNPs, contendo os RNA antígenômicos, permanecem no núcleo para servirem de molde para a síntese de mais cópias de RNA genômico. Em contraste, as RNPs que contêm os RNA genômicos são eficientemente exportadas para o citoplasma, principalmente em fases tardias do ciclo.

4.4 Morfogênese e egresso

Os ortomixovírus completam a sua morfogênese e são liberados das células hospedeiras pelo brotamento dos nucleocapsídeos na membrana plasmática. Nesse processo, o envelope que contém as glicoproteínas virais passa a se

constituir no envoltório externo dos vírions. O processo de morfogênese depende da síntese e direcionamento específicos das diferentes proteínas virais. As proteínas NP, PA, PB1 e PB2 são produzidas em ribossomos livres no citoplasma e importadas para o núcleo. Em fases iniciais do ciclo, essas proteínas participam da transcrição e replicação. Em fases tardias, associam-se com o RNA genômico, formando as RNPs, que são exportadas para o citoplasma e transportadas para a membrana plasmática. A M1 se conjuga com as RNPs e participa da sua exportação para o citoplasma e também é transportada para a face interna da membrana plasmática. As glicoproteínas HA e NA e a proteína M2 são produzidas em ribossomos associados ao retículo endoplasmático (RE). Durante a sua síntese, essas proteínas ficam inseridas na membrana do RE, com as regiões externas orientadas para o lúmen. Nesta organela, as proteínas sofrem modificações pós-tradução (mais notavelmente glicosilação) e são transportadas até o aparelho de Golgi, onde sofrem processamentos adicionais. As glicoproteínas são transportadas até a membrana plasmática em vesículas derivadas do aparelho de Golgi. Durante o transporte, a molécula precursora da HA (HA0) sofre clivagem proteolítica, originando a HA1 e HA2. Esses dois polipeptídeos permanecem unidos por pontes dissulfeto e formam a estrutura madura da HA. Nessa etapa, a M2 impede a acidificação excessiva dessas vesículas, permitindo a saída de prótons H⁺ para o citoplasma. Isso evita que a HA sofra precocemente as alterações conformacionais necessárias à infectividade viral. Acredita-se que a trimerização das moléculas de HA e a tetramerização da NA ocorram durante o transporte ou imediatamente após a fusão das vesículas com a membrana celular.

As vesículas contendo as glicoproteínas e a M2, eventualmente, fusionam com a membrana e, assim, as proteínas virais do envelope tornam-se inseridas na membrana plasmática. Tem sido observado que os trímeros de HA se distribuem uniformemente, em determinadas áreas da superfície celular, enquanto os tetrâmeros da NA e M2 se concentram em determinados locais.

O brotamento inicia com a interação das RNPs com as caudas das glicoproteínas, provavelmente mediado pela proteína M1 que reveste

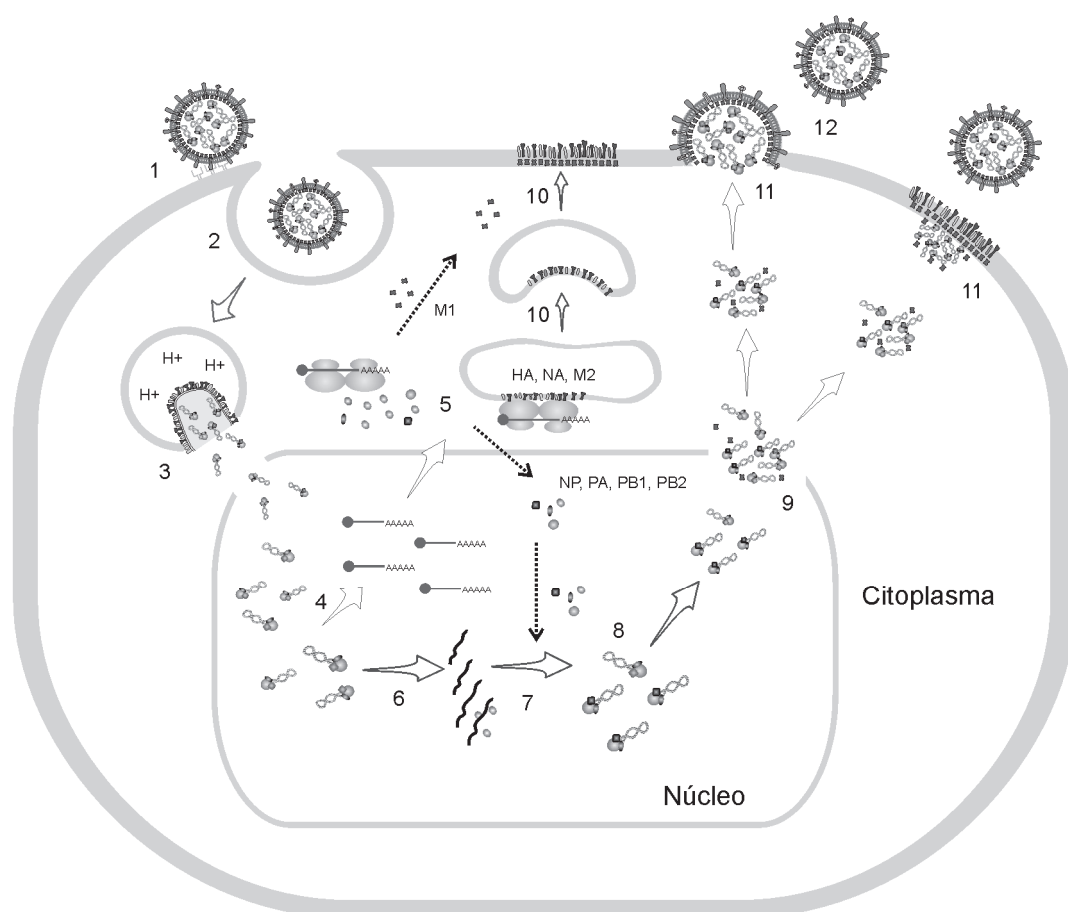


Figura 28.5. Ciclo replicativo do vírus da influenza A. 1) Ligação aos receptores; 2) Internalização por endocitose mediada por clatrina; 3) Fusão do envelope, desnudamento e penetração dos nucleocapsídeos; 4) Transcrição; 5) Produção das proteínas estruturais e não-estruturais; 6) Síntese de RNAs antigenômicos; 7) Síntese de RNAs genômicos; 8) Encapsidação dos RNAs genômicos pela proteína NP; 9) Exportação das RNPs para o citoplasma; 10) Transporte das glicoproteínas virais no interior de vesículas do Golgi para a membrana plasmática; 11) Interação das RNPs com a proteína M1 e com as caudas das glicoproteínas, resultando no brotamento; 12) Egresso.

internamente a membrana nesses locais ou está associada com as RNPs. A seguir, os complexos contendo as oito RNPs se inserem na membrana, adquirindo o envelope e sendo liberados da célula hospedeira. Acredita-se que a atividade neuraminidase da NA impeça que os vírions egressos fiquem aderidos à membrana, devido à ligação da HA com moléculas de ácido siálico.

A produção de partículas víricas infecciosas depende da inclusão de, pelo menos, uma cópia de cada RNA genômico por vírion. É possível que o empacotamento dos segmentos genômicos ocorra ao acaso, sem qualquer tipo de seleção. Partículas víricas, contendo mais ou menos de oito segmentos, podem facilmente ser detectadas, o que é compatível com o empacotamento ao

acaso. Assim, se oito segmentos forem incorporados em cada novo vírion, um em cada 400 vírions conterá o conjunto completo de segmentos. Este número situa-se dentro da relação entre o total de partículas e o número de partículas infecciosas observada em preparações do vírus, ou seja, uma proporção muito grande de partículas produzidas não é infecciosa, provavelmente por não conter o conjunto completo de RNAs genômicos. Por outro lado, evidências indicam que pode haver algum tipo de seleção que favorece a inclusão consistente de alguns segmentos genômicos, principalmente o segmento 1. Neste caso, o empacotamento dos segmentos não seria totalmente ao acaso. O ciclo replicativo dos ortomixovírus está ilustrado esquematicamente na Figura 28.5.

5 Genética dos vírus da influenza

Em seus hospedeiros naturais – as aves aquáticas e migratórias – os vírus da influenza são geneticamente estáveis e apresentam taxas mínimas de mutação e evolução ao longo do tempo. Isso indica uma relação ancestral e reflete uma perfeita adaptação do vírus com os seus hospedeiros. No entanto, quando são transmitidos para outras espécies (mamíferos ou aves), esses vírus iniciam um processo de rápida evolução genética, sobretudo devido a mutações em ponto nos genes que codificam as glicoproteínas de superfície.

A evolução dos vírus da influenza deve-se a dois mecanismos genéticos principais: mutações em ponto e reassortimento. As mutações em ponto surgem ao acaso durante a replicação do genoma e devem-se à baixa fidelidade da polimerase viral, que introduz nucleotídeos incorretos durante a síntese das novas moléculas de RNA. Quando ocorrem nos genes das glicoproteínas HA e NA, essas mutações podem resultar em alterações dos sítios reconhecidos por anticorpos neutralizantes. Isso representa uma vantagem evolutiva para os vírus mutantes, que podem escapar da neutralização e serem transmitidos a novos hospedeiros. As alterações antigênicas nas glicoproteínas de superfície (principalmente a HA), causadas pelo acúmulo gradual de mutações em ponto, são denominadas *antigenic drift*. Essas alterações são responsáveis pelos variantes que surgem continuamente e que permitem ao vírus da influenza humana se perpetuar na população, apesar da resposta imunológica dos hospedeiros. Esse tipo de evolução parece ser mais frequente e efetivo nos vírus da influenza A.

A natureza segmentada do genoma desses vírus permite a produção ocasional de recombinantes que possuem segmentos de dois vírus parentais. Esse tipo de recombinação, denominada reassortimento, pode ocorrer em infecções mistas por vírus de um mesmo tipo (A, B ou C), e não entre vírus de tipos diferentes (Figura 28.6). O reassortimento permite uma evolução rápida desses vírus e tem sido associado com variantes responsáveis por pandemias de grandes dimensões em humanos, como as de 1957 e 1968.

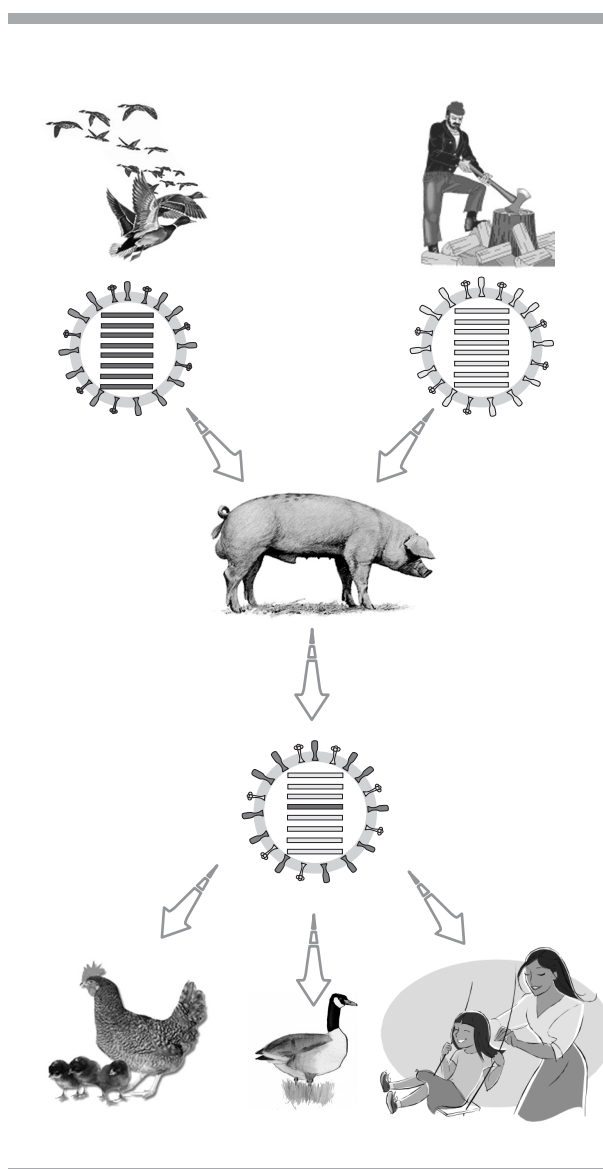


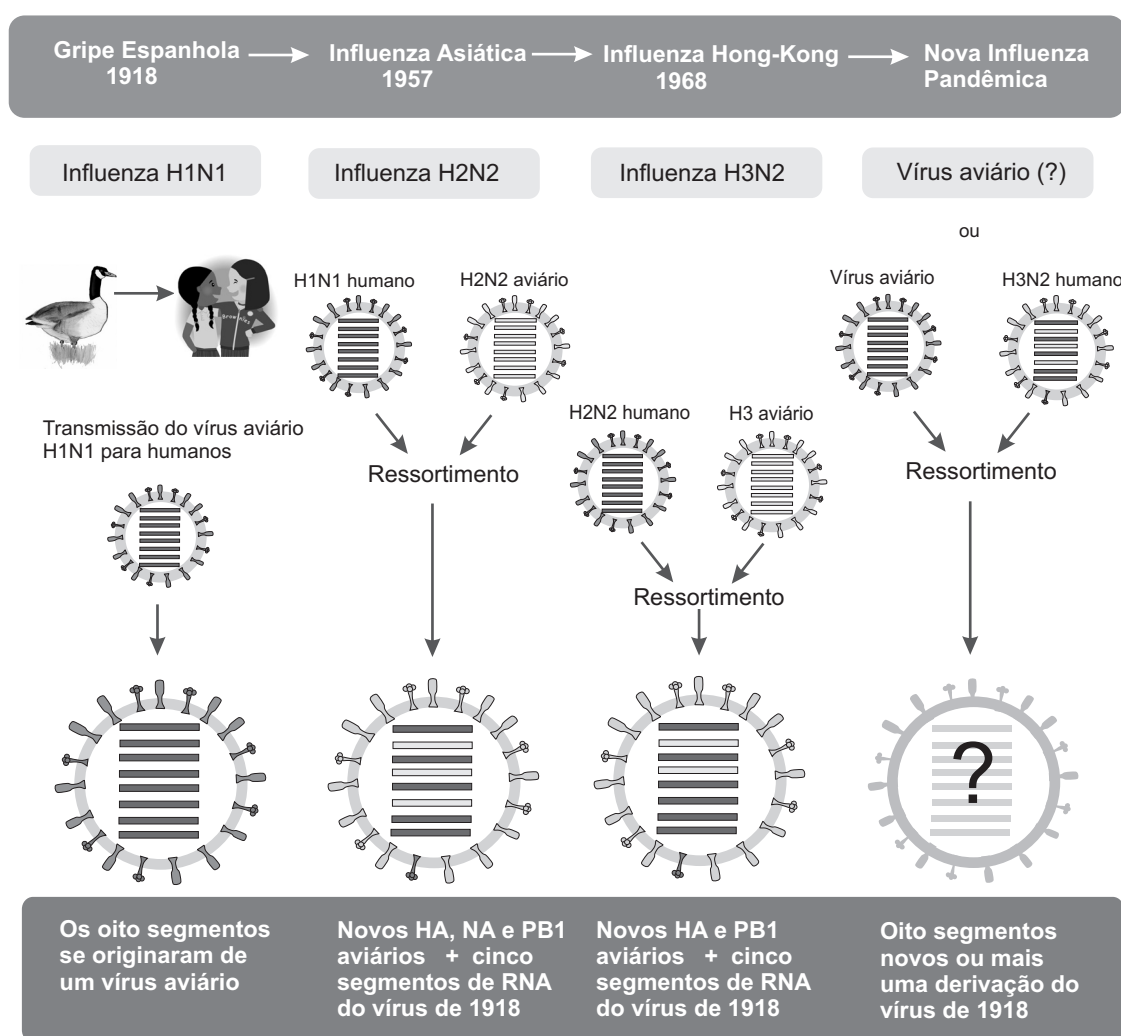
Figura 28.6. Ilustração demonstrando o reassortimento entre dois vírus da influenza. No exemplo, um suíno é infectado simultaneamente com um vírus aviário e outro humano. A co-infecção resulta no reassortimento entre esses dois vírus, com o qual o vírus de humano adquire o gene da hemaglutinina (HA) do vírus aviário. Esse recombinante possui propriedades antigênicas e patogênicas diferentes dos dois vírus parentais, e pode, potencialmente, infectar aves domésticas e selvagens, e também humanos. Os suínos se constituem na principal espécie em que ocorrem esses eventos, pois podem ser infectados tanto por vírus de mamíferos como aviários.

Os recombinantes podem resultar do reassortimento entre vírus da mesma espécie ou de espécies diferentes. O surgimento de vírus recombinantes que possuem as glicoproteínas HA e/ou NA adquiridas de um vírus de outra

espécie apresenta especial interesse, pois altera drasticamente as características antigênicas do vírus, evento denominado *antigenic shift*. O ressortimento entre vírus da influenza tem sido responsabilizado pelo surgimento de novas cepas, altamente patogênicas e capazes de produzir epidemias de grandes proporções, pois as populações afetadas não possuem imunidade contra os novos tipos de HA e NA presentes nesses novos vírus. Nas epidemias de 1957 e 1968, um vírus aviário realizou ressortimento com um vírus humano preexistente, gerando um terceiro vírus, responsável pelas epidemias (ver Figura 28.7). A

espécie suína é mais propensa a abrigar eventos de ressortimento entre vírus aviários e de mamíferos, pois possui o AS nas conformações $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$, utilizadas por vírus de aves e de mamíferos, respectivamente.

Confirmando essa hipótese, recombinantes derivados de ressortimento entre vírus aviários e humanos em suínos foram, subsequentemente, isolados de crianças na Holanda. Além disso, vírus contendo segmentos genômicos de vírus aviários, humanos e suínos têm sido isolados de suínos nos Estados Unidos desde 1998. Outros exemplos de ressortimento em infecções naturais



Adaptado de Webster et al. (2006)

Figura 28.7. Mecanismos responsáveis pelo surgimento de vírus pandêmicos da influenza A em humanos. O vírus que causou a gripe espanhola de 1918 (H1N1) era um vírus aviário que se adaptou a humanos (continha os oito segmentos genômicos de vírus aviário). Os vírus associados com as pandemias de 1957 e 1968 foram originados pelo ressortimento entre os vírus humanos então circulantes (H1N1 e H2N2, respectivamente) e vírus aviários. Antecipa-se que cepas capazes de causar grandes epidemias podem ser originadas por qualquer destes mecanismos. O vírus H5N1 é um dos candidatos a causar uma pandemia em humanos, caso adquira a capacidade de ser transmitido entre pessoas.

incluem um vírus suíno H1N1, que foi isolado de pessoas, e um H3N2, também suíno, isolado de perus nos EUA.

Independentemente de ressortimento, vírus de determinadas espécies podem, ocasionalmente, adaptar-se, infectar e se tornar patogênicos para outras espécies animais. Exemplos desses eventos são abundantes na literatura. O vírus que causou a gripe espanhola, em 1918, originou-se de aves, e todos os segmentos genômicos tiveram origem em um vírus aviário (Figura 28.7). Esse vírus foi inicialmente transmitido para humanos ou suínos, e depois se disseminou na população humana. Vírus da influenza A de suínos frequentemente são transmitidos para humanos, com consequências que variam desde infecções subclínicas até doença fatal. Desde 1974, pelo menos dez desses eventos foram bem documentados nos Estados Unidos, Europa e Nova Zelândia. Da mesma forma, vírus humanos podem ser transmitidos para suínos, podendo disseminar-se, proporcionando condições para a ocorrência de ressortimento com vírus dessa espécie. Recentemente, os casos de infecção de cães com o H3N8 eqüino e de diversas espécies com o H5N1 aviário demonstram que a barreira entre espécies pode ser ultrapassada, mesmo sem a ocorrência de ressortimento entre diferentes vírus. Em resumo, os vírus da influenza A apresentam uma especificidade de hospedeiro relativa e podem, ocasionalmente, via ressortimento ou mutações em determinados genes, adaptar-se e ser transmitidos a outras espécies.

6 Infecções de importância em veterinária causadas por ortomixovírus

6.1 Influenza eqüina

A influenza ou gripe eqüina é uma enfermidade que afeta as vias aéreas superiores dos eqüinos e se caracteriza pela disseminação rápida entre animais susceptíveis. A doença ocorre geralmente sob a forma de epizootia. A gripe eqüina trata-se de uma das enfermidades respiratórias mais importantes dessa espécie devido aos prejuízos econômicos causados, principalmente em animais de competição. Por essas razões, a

enfermidade tem sido alvo de intensos estudos nas últimas décadas. Os maiores avanços nos conhecimentos sobre a influenza eqüina incluem o reconhecimento de uma contínua variação antigênica do subtipo A/equi/2 (H3N8), a emergência de um novo vírus H3N8 a partir de um *pool* de genes de vírus aviários na China, e a recente ocorrência da infecção cruzada de cães com o subtipo H3N8 nos Estados Unidos.

O vírus da influenza eqüina (EIV) é classificado no gênero *influenzavirus A*, juntamente com os influenzavírus que infectam humanos, suínos e aves. Os influenzavírus do tipo A são divididos em subtipos de acordo com diferenças antigênicas nas glicoproteínas do envelope, HA e NA. Nesse sentido, dois subtipos do EIV foram identificados como causadores da enfermidade em eqüinos, o subtipo H7N7 ou equi-1; e o subtipo H3N8 ou equi-2. O subtipo H3N8 tem sido identificado em todos os surtos recentes, enquanto o H7N7 foi descrito, pela última vez, em 1979. Mutações em ponto nos genes das glicoproteínas HA e NA do subtipo H3N8 permitem ao vírus escapar da vigilância imunológica do hospedeiro e, conseqüentemente, disseminar-se na população.

6.1.1 Epidemiologia

Os EIVs se constituem nos principais agentes de doença respiratória em eqüinos em vários países. A enfermidade passou a ser diferenciada das demais viroses respiratórias de eqüídeos a partir de 1956, quando o vírus A/equi/Prague/1/56 (H7N7) foi isolado, pela primeira vez, durante uma epizootia na Europa Central. Posteriormente, em 1963, um segundo vírus foi isolado nos Estados Unidos e foi classificado como H3N8 (A/equi/Miami/2/63). Desde então, vários surtos relacionados ao EIV, principalmente ao subtipo H3N8, têm sido descritos em cavalos, mulas e asnos em diversas regiões, com exceção de alguns países, como Austrália, Nova Zelândia e Islândia, que permanecem livres da enfermidade.

As evidências dos casos de influenza eqüina, nos últimos 20 anos, indicam que o subtipo H7N7 está presente na população em níveis muito baixos ou pode até mesmo ter sido extinto. No entanto, a maioria dos países continua inserindo este subtipo na formulação das vacinas, uma vez

que variantes antigênicas do vírus poderiam ocasionar epizootias de grandes proporções.

A introdução e o uso extensivo de vacinas inativadas na América do Norte e na Europa, no final da década de 1960, reduziram a morbidade e severidade da doença. Entretanto, a infecção não foi controlada com sucesso. Quando uma nova variante antigênica é originada, epizootias graves ocorrem e são caracterizadas pela rápida disseminação e por surtos explosivos, envolvendo até 98% dos animais susceptíveis expostos.

Equinos de todas as idades são susceptíveis à infecção pelo EIV, principalmente aqueles que não tenham sofrido exposição prévia ao agente ou que não tenham sido vacinados. No entanto, a enfermidade tem maior prevalência em animais com idade inferior a dois anos. Além disso, a enfermidade aparece com maior frequência em animais que são transportados por longas distâncias ou confinados em locais pouco ventilados. O transporte e a aglomeração dos animais em locais escuros, com pouca ventilação, favorecem a ocorrência da enfermidade.

A enfermidade caracteriza-se pela alta morbidade e baixa mortalidade. A transmissão do vírus ocorre pelo contato direto ou indireto entre animais ou por meio de aerossóis contendo partículas víricas infecciosas. Equinos em fase de convalescença continuam excretando o vírus nas secreções nasais por um período de até 10 dias. As epizootias surgem quando um ou mais animais em fase subclínica (ou de incubação) ou convalescente são introduzidos em uma população susceptível. A severidade do surto depende das características antigênicas do vírus circulante e do estado imunológico da população no momento da exposição.

Os surtos de influenza podem ocorrer em qualquer época do ano, mas são mais comuns no outono, inverno e primavera, devido à mistura, confinamento e concentração de animais jovens para treinamentos, exposições ou para a venda. O estresse induzido por essas atividades pode aumentar a susceptibilidade à infecção, bem como, frequentemente, propicia ambientes escuros e pouco ventilados que favorecem a transmissão do vírus.

A enfermidade encontra-se amplamente disseminada na população equina do Brasil. As

evidências da disseminação da infecção pelo EIV no rebanho equino brasileiro incluem o isolamento e a detecção de anticorpos contra o vírus. O EIV já foi isolado de equinos com doença respiratória em vários estados brasileiros, incluindo São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. A caracterização desses isolados demonstrou que todos pertencem ao subtipo Equi-2 ou H3N8. Além de isolamentos, evidências sorológicas da infecção confirmam a ampla disseminação do agente no rebanho equino brasileiro. Estudos sorológicos realizados no Rio Grande do Sul, no Pará e no Rio de Janeiro demonstram prevalências de 65,7, 35,79 e 42,06%, respectivamente. Além disso, um estudo sorológico, realizado com amostras provenientes das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul, demonstrou altos índices de soropositividade em todas as regiões amostradas.

6.1.2 Patogenia, patologia e sinais clínicos

A infecção natural pelo EIV ocorre pela inalação de partículas víricas presentes em aerossóis, por contato direto ou indireto. A maioria das partículas inaladas deposita-se sobre a camada de muco que recobre as vias aéreas superiores. No entanto, algumas partículas conseguem penetrar mais profundamente e atingem as vias aéreas inferiores. A infecção das células do epitélio ciliar e a replicação viral nessas células levam à sua destruição e conseqüente liberação de partículas víricas infecciosas. A progênie viral se dissemina pelo trato respiratório superior, incluindo os seios nasais, a nasofaringe, a faringe e a traquéia. A superfície epitelial dessas regiões torna-se descamada e sem cílios. Conseqüentemente, alguns receptores são estimulados, causando a hipersecreção das glândulas serosas presentes na submucosa, prejudicando a função de proteção do epitélio muco-ciliar. Essas alterações permitem a invasão por patógenos oportunistas, como o *Streptococcus zooepidemicus* ou *Pasteurella* spp, e, conseqüentemente, a complicação da enfermidade.

A infecção das células do epitélio respiratório leva à hiperemia, edema, necrose, descamação e erosões focais no epitélio. Além disso, ocorre pro-

dução de um exsudato rico em proteínas nas vias aéreas e nos alvéolos. A interrupção da proteção muco-ciliar resulta em falha nos mecanismos de limpeza e, conseqüentemente, no acúmulo de secreções. A função macrofágica alveolar também fica prejudicada. A regeneração do epitélio respiratório leva pelo menos três semanas, mesmo na ausência de infecções bacterianas secundárias.

A severidade e a duração dos sinais clínicos dependem da dose e virulência da cepa viral, das condições ambientais e de manejo, e das defesas do hospedeiro, principalmente da imunidade prévia. O período de incubação geralmente é de um a três dias, podendo variar de 18 horas a sete dias. O aparecimento dos sinais é súbito, sendo a hipertermia (39,1-41,7°C) o primeiro sinal clínico a ser evidenciado. Essa febre pode ser bifásica, com duração de um a cinco dias em casos não-complicados. A fase febril freqüentemente é acompanhada por letargia, fraqueza, anorexia, secreção nasal serosa e tosse seca. Além disso, são descritos secreção lacrimal, aumento de volume dos linfonodos da cabeça, edema dos membros, laminite e pneumonia. Animais com infecções não-complicadas geralmente recuperam-se em duas a três semanas. A recuperação dos animais está diretamente relacionada com o grau de contaminação secundária e com o tipo de repouso ao qual o animal é submetido durante a enfermidade.

6.1.3 Imunidade

Uma característica importante do EIV é ausência de proteção cruzada entre os dois subtipos, H7N7 e H3N8. Essa característica torna necessária a inclusão dos dois subtipos na formulação de vacinas. A duração da imunidade protetora conferida pela vacinação é de três a quatro meses, dependendo do histórico prévio de vacinação e da dose do desafio. No entanto, mesmo animais que tenham sido regular e recentemente vacinados podem se infectar e excretar o vírus. As variações antigênicas dos vírus de campo podem reduzir a qualidade e a durabilidade da imunidade conferida pela infecção natural ou pela vacinação, pois anticorpos cruzados neutralizam o vírus menos eficientemente do que anticorpos contra o vírus homólogo.

Tem sido demonstrado que a infecção pelo EIV induz resposta celular por linfócitos T citotóxicos (CTL) e resposta humoral no trato respiratório de forma semelhante à observada na influenza humana.

6.1.4 Diagnóstico

Surtos de doença respiratória em eqüinos podem ser causados por vários agentes infecciosos, incluindo o vírus da arterite, os herpesvírus, rinovírus, adenovírus, além de bactérias como *Streptococcus equi*, *S. zooepidemicus* ou *S. pneumoniae*. O diagnóstico presuntivo da influenza eqüina, com base nos sinais clínicos e na rápida disseminação, deve ser confirmado pelo isolamento do vírus ou por de testes sorológicos.

Tradicionalmente, a confirmação laboratorial de uma suspeita clínica de influenza tem sido realizada pelo isolamento do vírus a partir de secreções nasais ou por testes sorológicos. Atualmente existe uma ampla variedade de testes laboratoriais de detecção de antígenos, ácido nucléico e células infectadas, que permitem a obtenção do diagnóstico mais rapidamente. O isolamento do EIV é realizado pela inoculação das amostras de secreção nasal na cavidade alantóide ou amniótica de ovos embrionados de galinha. O vírus pode ser adaptado para replicar em cultivos de células, incluindo de origem canina (MDCK), mas o isolamento inicial geralmente é feito em ovos embionados. Nos ovos inoculados, a presença do vírus é demonstrada pela prova de hemaglutinação, utilizando-se eritrócitos de galinha. Para a confirmação da etiologia e caracterização do vírus isolado, realiza-se a prova de HI, utilizando-se um soro imune específico.

Testes imunoenzimáticos (ELISA) de captura têm sido utilizados no diagnóstico da influenza humana e estão sendo padronizados para a detecção rápida de antígenos do vírus A/equi/2 em suabes nasais de animais suspeitos. A técnica de IFA também tem sido empregada para a detecção de antígenos do EIV em células do trato respiratório, obtidas por raspado nasal ou lavado traqueal. Além desses métodos de detecção de antígenos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) também vem sendo utilizada para a detecção do ácido nucléico viral.

Os métodos sorológicos também são muito usados para a confirmação do diagnóstico de influenza. No entanto, a necessidade de coleta de soro pareado com intervalos de 14 a 21 dias, constitui-se em uma das principais limitações para a sua utilização. Os testes utilizados para a detecção de anticorpos contra o EIV incluem a HI, fixação do complemento (CF), soro neutralização (SN) e ELISA. O teste de HI é o teste padrão para a detecção de anticorpos contra o EIV e permite a diferenciação entre os dois subtipos do vírus, uma vez que os anticorpos inibidores da hemaglutinação são específicos para cada subtipo do vírus.

6.1.5 Profilaxia e controle

A natureza altamente infecciosa e contagiosa do EIV requer a realização de quarentena de todos os animais com sinais respiratórios por pelo menos sete semanas para prevenir uma maior disseminação da infecção. Particular atenção deve ser dada aos potros e animais jovens, que devem ser mantidos afastados dos animais doentes. Além disso, é necessário que os equipamentos utilizados para a manipulação dos animais doentes não sejam utilizados nos animais saudáveis. Os tratadores e veterinários devem realizar o tratamento e a manipulação dos animais doentes após terem manejado os animais saudáveis, evitando o contato com os equinos saudáveis após terem entrado em contato com os animais doentes.

A prevenção também pode ser feita pela vacinação com vacinas inativadas. No entanto, a imunidade conferida é de curta duração e reforços frequentes são necessários. Alguns estudos demonstram que, no mínimo, 70% de uma população precisa ser vacinada para que epidemias da enfermidade sejam prevenidas. Tipicamente, a geração de vacinas que está disponível atualmente consiste de vacinas com vírus inativado, contendo adjuvantes para potencializar a imunogenicidade. Usualmente a mistura de vírus inclui uma cepa viral do subtipo equi-1 (H7N7) e outra do subtipo equi-2 (H3N8). A razão para incluir múltiplas cepas na formulação das vacinas é a possibilidade de mutações nas cepas circulantes, resultando em variantes antigênicas.

Os programas de vacinação para a influenza equina consistem em uma primeira vacinação, seguida por uma segunda dose com três a seis semanas de intervalo. Além disso, são necessários reforços semestrais ou anuais, dependendo das recomendações do fabricante. Os surtos de influenza equina não são sazonais, como na influenza humana, mas são frequentemente associados a feiras e competições. Por isso, a revacinação dos animais antes desses eventos é recomendada. As éguas gestantes devem ser vacinadas um mês antes do parto, e os potros deverão receber a primeira dose da vacina após o decréscimo da imunidade colostrar, por volta dos quatro a seis meses de idade.

Novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para resolver o problema da curta duração da imunidade conferida pelas vacinas inativadas. Na Europa, vacinas contendo complexos imunoestimulantes (ISCOMs) foram desenvolvidas, mas, após quatro anos de uso e testes a campo, não foi demonstrada a sua superioridade em relação às vacinas convencionais. Vacinas vivas atenuadas, algumas obtidas por recombinação genética, também estão em fase de pesquisa e testes.

6.2 Influenza suína

A influenza suína (*swine influenza*, SI) é uma enfermidade respiratória, infecciosa e aguda, causada pelo vírus da influenza suína tipo A (SIV). Os sinais clínicos característicos são: tosse, dispnéia, febre, anorexia e prostração, seguidos de rápida recuperação. A gravidade da infecção varia de acordo com a cepa viral, idade do animal, condição imunológica e presença de infecções concomitantes. Os sinais clínicos e lesões geralmente apresentam rápida regressão, mas casos de pneumonia fatal podem ocorrer ocasionalmente.

A primeira descrição da doença data de 1918, no Meio-Oeste dos Estados Unidos, na mesma época em que ocorria a maior pandemia de influenza humana, responsável pela morte de mais de 20 milhões de pessoas. A doença em suínos apresentava muitas semelhanças clínicas e patológicas com a influenza humana. O isolamento do agente foi realizado em 1930 e, nos anos seguintes, foram realizados vários estudos

sobre imunidade, transmissão, hospedeiros, relações antigênicas com os outros vírus da influenza, formas de manutenção na natureza, entre outros. Até 1975 existiam poucos relatos da doença em outros países além dos Estados Unidos, mas a partir dessa época, vários casos de doença clínica e rebanhos com sorologia positiva foram descritos em diferentes países.

6.2.1 Características do vírus

Os suínos são susceptíveis à infecção com diferentes variantes do SIV, incluindo os vírus H1N1, clássicos de influenza suína circulantes nos Estados Unidos desde o início do século XX. A espécie suína também é susceptível ao H1N1 recombinante (ressortante), que contém glicoproteínas de superfície do vírus clássico e proteínas internas de vírus mais recentes como o H3N2 ou H1N2. Outros subtipos isolados de suínos incluem o H1N7 e H9N2.

A imunidade contra o H1N1 não protege contra o H3N2 e características antigênicas do H1N1 clássico e das variantes de H1N1 de aves indicam que esses vírus permanecem conservados desde sua introdução na população suína. Os H3N2 são vírus menos estáveis, e isolados mais recentes apresentaram algumas variações antigênicas quando comparados ao protótipo. O gene da HA do SIV não apresenta muita variação antigênica e uma das hipóteses para esse fato é a falta de pressão de seleção, já que existem sempre muitos suínos sem imunidade prévia ao agente na população susceptível.

A região globular da HA do vírus é responsável pela ligação aos receptores celulares AS ou acetil-neuramínico. O tipo de ligação do AS com a galactose na molécula de glicolípido difere entre os hospedeiros dos vírus da influenza, e o tipo de ligação é o maior determinante de especificidade desses vírus. Em aves, o AS está ligado à cadeia de açúcar na posição $\alpha 2,3$, e os vírus isolados de aves possuem uma HA com alta afinidade para este tipo de ligação. Na traquéia de humanos, a ligação encontrada é do tipo $\alpha 2,6$, e os vírus que infectam humanos têm preferência por esse tipo de ligação. Os suínos possuem, em seu trato respiratório, moléculas de AS tanto em ligação $\alpha 2,3$

como $\alpha 2,6$, e, por isso, podem potencialmente ser infectados por vírus aviários e humanos. Por essa característica, a espécie suína é considerada o “receptáculo de ressortimento” entre vírus aviários e de mamíferos.

6.2.2 Epidemiologia

O isolamento do vírus H1N1 (A/swine/Iowa/15/30) e estudos sorológicos retrospectivos em humanos sugerem que o vírus de suínos é antigenicamente semelhante ao vírus de humanos, responsável pela pandemia de 1918. Estudos recentes indicam que esse vírus se originou de um vírus aviário, pois todos os seus oito segmentos genômicos são muito semelhantes aos encontrados em vírus de aves. A dúvida que permanece é a de quais hospedeiros foram infectados primeiro: suínos ou humanos? Desde 1918 o agente permanece circulante na população suína e é responsável por doença em rebanhos suínos na América do Norte.

O vírus circula na população suína ao longo do ano, mas os surtos são mais frequentes no final do outono e inverno. O aparecimento da doença está associado principalmente com a movimentação de animais e introdução de animais nos rebanhos. A principal forma de transmissão é a direta, pela via nasofaríngea, por contato com secreções nasais de animais na fase febril da infecção. Em regiões com alta densidade de suínos, a disseminação aerógena pode ser importante, especialmente nas populações sem imunidade. A morbidade pode chegar a 100%, mas a mortalidade é baixa (1% ou menos).

O H1N1 clássico é o subtipo mais comumente identificado e estima-se que 25% da população de suínos do mundo possua sorologia positiva para este agente. Nos Estados Unidos, 30% dos suínos apresentam sorologia positiva para o subtipo H1N1 e, na região Centro-Norte daquele país, 51% dos suínos são positivos. Na Bélgica, entre 2001 e 2003, foram identificadas matrizes com anticorpos para dois (48%) ou três subtipos virais (31%) de influenza suína. Outros subtipos já relatados em suínos incluem o H9N2, H1N2 (derivado de vírus de aves), H1N7 (derivado de vírus de humanos e eqüinos) e H4N6. O H1N1

foi isolado de suínos no Japão em 1978; na França, em 1987 e 1988, e na Grã-Bretanha, em 1994. O H3N1 e H1N7 foram isolados na Grã-Bretanha em 1990. No Brasil, até o momento, não existem casos confirmados de influenza suína.

A infecção de suínos com o H3N2 de humanos também tem sido demonstrada. O vírus A/Hong Kong/68 foi isolado de suínos no Taiwan, logo após seu aparecimento na população humana.

A origem dos isolados de suínos difere entre os continentes. O H1N1, predominante na Europa, teve origem em vírus de aves e foi introduzido por patos selvagens na população suína em 1979. As diferenças entre os vírus têm implicações práticas para a realização do diagnóstico e controle, e, portanto, as cepas utilizadas para diagnóstico na Europa e nos Estados Unidos são diferentes.

Em geral, os vírus de influenza de suínos não infectam humanos. No entanto, já foram relatados alguns casos de infecção de pessoas que trabalhavam diretamente com esses animais. Já foram descritos aproximadamente 14 episódios de influenza por vírus suínos em humanos, com seis mortes por pneumonia. A maioria dos casos foi de pessoas que se infectaram após contato próximo com suínos. Em 1976, durante um surto em Nova Jersey, EUA, 500 pessoas adoeceram com o vírus H1N1, o mesmo identificado em suínos na época. No entanto, nunca foi realmente provado que os suínos serviram de fonte de vírus para humanos. Anticorpos contra o SIV foram identificados em diversos países, em pessoas que mantinham contato próximo com suínos, mas a ocorrência de doença clínica não é freqüente. Em um surto em Wisconsin, EUA, em 1988, foram identificados casos de humanos infectados e evidências sorológicas da transmissão de pacientes para funcionários da área de saúde que tiveram em contato com as pessoas infectadas.

Como os suínos são susceptíveis tanto aos vírus aviários quanto aos vírus humanos, estão freqüentemente envolvidos na transmissão interespecíes. Os vírus da influenza aviária não replicam de forma eficiente em células de humanos e primatas, e os vírus de humanos não replicam bem em células de aves. Entretanto, os vírus de aves e de humanos replicam de forma eficiente

em células de suínos, por isso a recombinação pode ocorrer nas células da traquéia de suínos. Com a replicação contínua em suínos, alguns subtipos aviários podem passar a reconhecer os receptores de células humanas. Uma recente descoberta demonstrou que não apenas os suínos, mas também os humanos possuem células com os dois diferentes tipos de ligação ($\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$). A ligação $\alpha 2,6$ está presente no trato respiratório superior; e a $\alpha 2,3$, no trato respiratório inferior. Essa nova descoberta sugere que a transmissão direta de vírus da influenza de aves para humanos pode ocorrer sem a utilização do suíno como intermediário do ressortimento genético.

Vários fatores podem potencialmente limitar a transmissão do SIV de uma espécie para outra, mas esses fatores não são completamente conhecidos. As barreiras impostas pela preferência de receptores específicos são importantes, entretanto os mecanismos virais ainda são pouco conhecidos.

6.2.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia

Os animais se infectam pela inalação de aerossóis ou pelo contato direto ou indireto com animais ou secreções contaminadas. A infecção geralmente é limitada ao trato respiratório e viremia é raramente detectada. A replicação viral já foi demonstrada na mucosa nasal, tonsilas, traquéia, linfonodos traqueobronquiais e pulmões. Células positivas para antígenos virais são encontradas no epitélio bronquial após duas horas de infecção, e, após 16 horas, podem ser observadas grandes áreas infectadas no epitélio bronquial. Antígenos virais também podem ser detectados nos septos alveolares após quatro horas de infecção, e, após 24 horas, aparecem numerosos focos de infecção nas células dos alvéolos e ductos.

Pouco se sabe sobre a patogenia da influenza suína, mas estudos sugerem que a produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon- α (IFN- α), e as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) contribuam para os efeitos inflamatórios observados nos pulmões. Os sinais de febre, anorexia e de inflamação pulmonar são mais evidentes após 24 horas de infecção, perío-

do que coincide com o pico de replicação viral e produção de citocinas.

Estudos de hibridização *in-situ* demonstram que o vírus H1N2 pode ser detectado nos mesmos tecidos que apresentam lesões. Os pulmões são, provavelmente, os principais sítios de replicação do SIV. O RNA viral pode ser detectado nas células epiteliais dos brônquios, bronquíolos, pneumócitos e macrófagos alveolares e intersticiais, e a distribuição varia com o curso e fase da infecção.

A detecção do H1N2 no epitélio dos brônquios e bronquíolos sugere que as células epiteliais desses locais representem os sítios iniciais de infecção, e que a replicação viral induz lesões nesses tecidos, impedindo a ação dos mecanismos de defesa muco-ciliar. A associação de patógenos, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus* spp e *Pasteurella multocida*, produz doença respiratória associada com alta mortalidade.

Os sinais clínicos observados na influenza suína incluem anorexia, prostração e febre. Também são observados animais com dispnéia e hesitação em se movimentar. A movimentação dos animais pode ser acompanhada de tosse grave. A perda de peso pode ser elevada, mas a mortalidade geralmente é baixa, exceto em casos de infecções concomitantes. Os animais se recuperam após cinco a sete dias, e os sinais clínicos geralmente desaparecem de forma súbita.

Além dos sinais clínicos típicos, podem ocorrer infecções subclínicas. Fatores como imunidade, idade, pressão de infecção, infecções intercorrentes e condições climáticas podem determinar a severidade clínica da infecção. Não existem evidências de diferentes graus de virulência em infecções com diferentes subtipos virais.

As lesões macroscópicas da forma não-complicada da doença são geralmente de pneumonia viral. As alterações geralmente são limitadas aos lobos apical e cardíaco dos pulmões, entretanto, em casos graves, mais de 50% dos pulmões podem ser afetados. Pode ser evidenciado edema interlobular, e as vias aéreas podem estar preenchidas por exsudato fibrinoso tingido de sangue. Pode, ainda, ocorrer aumento de volume dos linfonodos mediastínicos e bronquiais.

As alterações histológicas mais frequentes são degeneração e necrose das células epiteliais dos brônquios e bronquíolos, que podem estar preenchidos por exsudato. Também pode ocorrer hiperemia e dilatação dos capilares, com infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário intersticial. Essas lesões são mais acentuadas com a variante H1N1.

6.2.4 Imunidade

Níveis elevados de anticorpos têm sido detectados até seis meses após a infecção. A relação entre a quantidade de anticorpos no soro ou nas vias respiratórias e a resistência à infecção não é bem estabelecida, ocorrendo muitas variações individuais dos suínos após a exposição.

Os anticorpos maternos contra o vírus persistem por dois a quatro meses, variando de acordo com o nível inicial. Suínos lactentes com anticorpos maternos podem se infectar e excretar o vírus, mas a gravidade dos sinais clínicos e a taxa de excreção viral são inversamente proporcionais ao nível de anticorpos maternos.

Após a queda na taxa de anticorpos maternos, os suínos podem se infectar novamente, eliminar o vírus e apresentar sinais clínicos da doença.

6.2.5 Diagnóstico

Surtos de doença respiratória aguda em suínos, envolvendo um número elevado de animais, devem ser necessariamente investigados para influenza. O diagnóstico definitivo requer o isolamento e identificação do vírus ou detecção de anticorpos específicos contra o SIV.

O isolamento viral pode ser realizado a partir de suabes, coletados do muco nasal ou do muco da faringe. A fase ideal para a coleta dos suabes é o período febril, pela maior possibilidade de detecção do vírus. Os suabes devem ser acondicionados em tubos e enviados ao laboratório no máximo 48 horas após a coleta, em meio de transporte apropriado. O vírus também pode ser isolado do pulmão de animais que morreram ou foram submetidos à eutanásia na fase aguda da doença.

Ovos de galinha embrionados com 10 dias são muito utilizados para o isolamento de influenza tipo A. O vírus geralmente não mata o embrião, e o líquido alantóide deve ser coletado após 72 horas de incubação e testado para a presença de atividade hemaglutinante com eritrócitos de galinha. O subtipo pode ser identificado pela técnica de HI.

Podem ainda ser utilizadas a imunofluorescência direta (IFD) para tecidos pulmonares, imunofluorescência indireta (IFI) em células do epitélio nasal, imunoistoquímica em tecido fixados (IHQ), ELISA e reação em cadeia da polimerase acoplado à transcrição reversa (RT-PCR) em tecidos e/ou células descamativas do epitélio.

Testes sorológicos para diagnóstico de infecção pelo SIV consistem em sorologia pareada pela técnica de HI, com uma coleta durante a fase aguda e a segunda três a quatro semanas após, para investigar o aumento do nível de anticorpos.

6.2.6 Profilaxia e controle

Não existe tratamento específico para a doença. Recomenda-se manter os animais em local limpo e seco e não os transportar durante a fase aguda da enfermidade. Expectorantes e antimicrobianos podem ser utilizados para a prevenção de infecções bacterianas secundárias. As medidas de biossegurança auxiliam na prevenção da introdução do SIV na população suína. Como a transmissão do vírus pode ocorrer entre diferentes espécies, as medidas de biossegurança incluem evitar o contato com outras espécies, especialmente aves.

Existe uma grande variação na resposta de anticorpos e na proteção de suínos após a vacinação. Existem vacinas inativadas com os vírus H1N1 e H3N2 nos Estados Unidos e Europa, onde a vacinação contra o SIV é uma prática comum. Os suínos devem ser vacinados após os 10 meses de idade, pois, nos primeiros meses de vida, pode ocorrer a interferência de anticorpos maternos, caso a matriz tenha sido vacinada ou infectada previamente.

6.3 Influenza aviária

O primeiro relato da influenza aviária data de 1878, na Itália, mas o vírus só foi identificado em 1955. As manifestações clínicas induzidas pela infecção são principalmente respiratórias e gastrintestinais. No entanto, o vírus pode produzir desde infecção assintomática até uma enfermidade sistêmica ou neurológica, que pode resultar em taxas de mortalidade de até 100%. No início, apenas surtos da forma severa da doença eram registrados, mas, posteriormente, observou-se que poderia ocorrer uma forma mais leve da doença causada pelo mesmo vírus.

Atualmente sabe-se que existem cepas com dois graus distintos de patogenicidade. As cepas conhecidas como influenza aviária altamente patogênicas (IAAP) são responsáveis pela forma severa da doença, que é importante na avicultura comercial de todo o mundo. Os vírus de patogenicidade média (IAMP) causam infecções que variam desde assintomáticas até doença respiratória e gastrentérica. Na literatura científica, os IAMP são frequentemente denominados como de baixa patogenicidade. No entanto, neste capítulo, será utilizado o termo oficialmente utilizado pela OIE, isto é, influenza aviária de patogenicidade média.

Os vírus da influenza aviária são agentes infecciosos de grande interesse também para a saúde pública por originarem vírus de alta virulência para humanos. A seguir, serão descritos alguns aspectos relacionados com vírus da influenza aviária e da enfermidade em aves.

6.3.1 Características do vírus

O vírus da influenza das aves pertence ao gênero Influenza A. Como os demais vírus desse gênero, possuem vírions pleomórficos, envelopados e RNA segmentado como material genético. As diferenças estruturais observadas entre as cepas de alta e média patogenicidade estão concentradas principalmente na HA. As cepas de alta

patogenicidade apresentam um número maior de aminoácidos básicos na região de clivagem da HA0 em HA1 e HA2. Outra diferença que pode ter consequências na patogenicidade das cepas é a ausência de sítios de glicosilação de aminoácidos, que são geralmente encontrados nessa região em cepas de patogenicidade média.

6.3.2 Epidemiologia

Os vírus da influenza aviária que infectam aves domésticas são, em grande parte, remotamente originários de aves silvestres. O vírus já foi detectado em 100 espécies, pertencentes a 26 diferentes famílias e pelo menos 12 ordens. As aves silvestres aquáticas classificadas na família *Anatidae*, ordem *Anseriformes*, são citadas como os principais reservatórios do vírus na natureza. A transmissão provavelmente ocorra pela transferência do vírus presente em fezes contaminadas das aves silvestres para aves domésticas, mecanicamente, através de outros animais, humanos, alimentos ou água. Outras fontes de infecção são suínos infectados, aves de estimação ou aves domésticas endemicamente infectadas.

O vírus é excretado em grandes quantidades nas fezes e nas secreções respiratórias das aves infectadas durante o período clínico e por um tempo variável após a recuperação. Em galinhas, este período pode se estender por até 36 dias após a infecção.

A transmissão horizontal é a forma mais comum de transmissão, ocorrendo de aves infectadas para aves susceptíveis através de fômites ou por via aerógena. O contato com equipamentos, roupas ou sapatos contaminados com fezes também são importantes fontes de infecção. A transmissão por via aerógena ocorre entre animais da mesma criação ou, possivelmente, entre aviários próximos, embora esta via não seja considerada a mais importante.

Os 16 subtipos de HA e os nove subtipos de neuraminidase (NA) já foram identificados em aves silvestres ou domésticas em diferentes combinações. Os isolados mais recentes que causaram doença em aves domésticas foram: H5N2, H7N1, H7N3, H7N7, H9N2 e H5N1. Até o momento, apenas os subtipos H5 e H7 estão associa-

dos com o surgimento de cepas de alta patogenicidade, enquanto os demais subtipos são isolados de surtos da doença causados por cepas de média patogenicidade. No entanto, deve-se ressaltar que os subtipos H5 e H7 podem também estar envolvidos em surtos de média patogenicidade. Alguns surtos causados por vírus desses dois subtipos foram inicialmente de média patogenicidade e, após a circulação por algum tempo na população, o vírus sofreu modificações genéticas e passou a apresentar alta patogenicidade.

Vinte e quatro surtos da forma altamente patogênica da doença foram descritos desde 1959 em todo o mundo, sendo que 11 tiveram, como agente etiológico, um vírus do subtipo H5, e 13 foram causados por um subtipo H7.

Dentre os vírus de média patogenicidade, o H9N2 merece consideração especial por estar circulando de forma endêmica em vários países desde a metade dos anos 1990. Entre os anos de 1994 e 2004, este vírus foi detectado na Alemanha, Itália, Irlanda, África do Sul, Estados Unidos e Coreia. Recentemente surtos de influenza pelo H9N2 foram descritos em galinhas no Oriente Médio, envolvendo o Irã, Arábia Saudita, Israel, Jordânia, Kuwait, Líbia, Líbano, Iraque e outros países da Ásia, como China, Coreia e Paquistão.

As cepas do vírus da influenza que circulam entre aves silvestres são de média patogenicidade. A transformação de uma cepa de média patogenicidade em cepa de alta patogenicidade parece ocorrer nas aves domésticas logo após a sua introdução a partir de espécies silvestres. Os mecanismos que induzem esta transformação são complexos e não totalmente esclarecidos, mas estão ligados a alterações observadas na HA após a aquisição de múltiplos aminoácidos básicos e perda de sítios de glicosilação. Eventos de mutação ou recombinação parecem estar associados com essas modificações e, possivelmente, mais de um mecanismo possa contribuir para esta alteração de patogenicidade.

No Brasil, não há registro recente de diagnóstico clínico ou laboratorial da influenza em aves comerciais. O subtipo H3 foi recentemente isolado de aves silvestres nos estados do Amazonas e Rio Grande do Norte, entretanto não existem evidências de transmissão desse vírus para aves domésticas.

6.3.3 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A patogenia da influenza aviária é mais conhecida em aves de produção, como galinhas e perus. A influenza das aves é conhecida como tipicamente de manifestações clínicas respiratórias e gastrintestinais. Entretanto, os sinais clínicos podem variar amplamente, dependendo da cepa infectante. A patogenicidade de cada isolado do vírus da influenza também pode variar de acordo com a espécie infectada. Já foram descritos isolados de campo que não causaram doença em galinhas, mas causaram doença grave em perus.

A infecção ocorre por inalação ou ingestão de material contaminado, e o período de incubação é de um a três dias. Após a penetração, a replicação das cepas de média patogenicidade é restrita às células dos tratos respiratório e intestinal. As lesões causadas pelo vírus podem facilitar infecções bacterianas secundárias. Esta predisposição pode estar ligada a uma depressão nas funções dos macrófagos, induzida pela replicação viral. As aves afetadas manifestam lesões inflamatórias no trato respiratório, principalmente nos seios nasais, edema e congestão na mucosa traqueal com exsudato seroso ou caseoso e, eventualmente, hemorragias. Pode ocorrer também aero-saculite e, se houver infecção bacteriana secundária, o quadro pode evoluir para uma broncopneumonia fibrinopurulenta. Outras lesões possíveis incluem enterite, lesões inflamatórias nos ovidutos e regressão dos ovários.

A infecção por cepas altamente patogênicas cursa com a disseminação sistêmica do vírus e sua replicação em vários órgãos, com conseqüente aparecimento de lesões disseminadas. A presença de múltiplos resíduos básicos na região da clivagem da HA das cepas altamente patogênicas permite que a clivagem seja realizada por enzimas encontradas em vários tecidos. Isso facilita a propagação dessas cepas por diversos órgãos e tecidos, enquanto a enzima necessária para a clivagem da HA nas cepas de média patogenicidade somente é encontrada nos tratos respiratório e intestinal.

As lesões causadas pelas cepas altamente patogênicas podem apresentar variações, mas

edema da cabeça e pescoço, necrose na crista e barbeta, hemorragias e focos de necrose em múltiplos órgãos viscerais são freqüentemente descritos. Aves que apresentam a forma superaguda da doença podem morrer mesmo antes de apresentar lesões.

A infecção de aves domésticas com cepas de baixa virulência pode causar desde infecções assintomáticas, até manifestações severas de doença, afetando os tratos respiratório, intestinal e urinário. Nas aves doentes, pode-se observar tosse, espirro, estertores, lacrimação excessiva, queda na produção de ovos, perda do apetite e diarreia. Os sinais clínicos podem ser mais severos se houver infecção secundária com outros vírus ou bactérias. As cepas de alta virulência (HPAI) podem causar morte de galinhas e perus sem outras manifestações clínicas. Nas aves que sobrevivem por algum tempo, podem ser observados diferentes quadros clínicos. Entre esses, pode-se citar a perda do apetite, a queda de postura, espirros, tosse, estertores, diarreia, distúrbios de origem nervosa (como tremores da cabeça e pescoço), torcicolo e opistótono, edema da cabeça e pescoço e cianose da pele nas regiões sem penas.

6.3.4 Imunidade

O principal mecanismo efetor envolvido na proteção das aves contra o vírus da influenza é representado pelos anticorpos neutralizantes. Os anticorpos são produzidos contra várias proteínas estruturais e não-estruturais, mas apenas os anticorpos contra as proteínas externas do vírus, HA, NA e M2 possuem atividade neutralizante. A resposta humoral de aves contra o vírus da influenza ocorre de forma similar ao que ocorre com outros vírus nesta espécie e com o mesmo vírus em outras espécies. Aproximadamente cinco dias após a infecção, pode-se detectar anticorpos específicos da classe IgM no soro e, posteriormente, ocorre o aparecimento de IgG (IgY). A resposta humoral ocorre também nas mucosas, mas pouco tem sido estudado sobre este mecanismo.

O principal alvo da resposta imune humoral é a HA, em cuja estrutura foram identificados pelo menos cinco determinantes antigênicos neutralizantes. Uma boa resposta de anticorpos

contra a HA parece ser suficiente para a proteção contra a doença, embora a presença simultânea de anticorpos contra a HA e NA aparentemente induz uma melhor proteção. A infecção ou vacinação com um subtipo de HA ou NA induz neutralização de outros vírus do mesmo subtipo, mas não induzem neutralização ou proteção contra outros subtipos. Portanto, a proteção é específica para o subtipo. Anticorpos produzidos contra a nucleoproteína (NP) e a proteína M1 também podem ser detectados no soro de aves vacinadas ou infectadas. Esses anticorpos são utilizados em testes diagnósticos para a determinação do tipo de vírus influenza, mas, por serem direcionados contra proteínas internas, não parecem possuir papel importante na proteção contra o vírus.

Informações sobre a resposta imune celular contra o vírus da influenza em aves são raras. Apesar disso, evidências indiretas demonstram que este ramo da resposta imune também participa na proteção contra o vírus. A transferência de linfócitos T CD8⁺ de galinhas inoculadas com o vírus H9N2 e desafiadas com o H5N1 protegeu os animais contra o desafio, indicando que a resposta imune celular é importante.

6.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de influenza aviária é obrigatoriamente realizado por um laboratório de referência do Ministério da Agricultura ou órgão equivalente em cada país. No Brasil, existem vários laboratórios oficiais do Ministério habilitados para realizar o diagnóstico.

O diagnóstico laboratorial é realizado pela detecção direta do vírus ou pelo isolamento e identificação viral a partir do material enviado para o laboratório. As amostras preferenciais para o diagnóstico são secreções traqueais e cloacais coletadas com o auxílio de suabes. Os suabes devem ser transportados em meio estéril, acrescido de antibióticos. As amostras podem ser conservadas a 4°C se processadas em até 48 horas após a coleta. Após esse período, é recomendado que as amostras sejam estocadas a -70°C. As vísceras de animais mortos também devem ser coletadas, principalmente se houver a suspeita de infecção

com as cepas altamente patogênicas. Nesses casos, traquéia, pulmão, sacos aéreos, intestino, rim, fígado, coração, sangue, baço e cérebro são os órgãos de eleição.

A inoculação do material suspeito em ovos embrionados de galinha, com posterior identificação por técnicas sorológicas, é o método de diagnóstico mais comumente utilizado. Com este objetivo, embriões de nove a onze dias de incubação são inoculados na cavidade alantóide. Setenta e duas horas após a inoculação, os ovos embrionados são resfriados a 4°C por algumas horas. O líquido alantóide é coletado, e a presença do vírus nesse material é determinada pela detecção de atividade hemaglutinante pelo teste de hemaglutinação (HA).

Após a determinação da atividade hemaglutinante, o vírus deve ser identificado com relação ao seu tipo e subtipo. A identificação do tipo viral (A, B, C) pode ser realizada através do teste de imunodifusão ou ELISA, ou, ainda, pela detecção de antígenos virais na membrana cório-alantóide do embrião, através das técnicas de IFA ou IPX. Para a realização desses testes, são utilizados anticorpos direcionados para a proteína matriz (M) ou nucleoproteína (NP).

A identificação do vírus em subtipos é realizada pelas técnicas de inibição da hemaglutinação (HI) ou inibição da neuraminidase (NI) com a utilização de anticorpos específicos para cada um dos tipos de HA e NA.

Testes sorológicos podem ser também utilizados para a detecção de anticorpos no soro de aves que foram potencialmente infectadas. Nesse caso, os testes são aplicados em programas de vigilância e determinação de prevalência do vírus em populações específicas, e não como diagnóstico de surtos. Nesses casos, os testes recomendados são a imunodifusão, ELISA, HI e NI.

Recentemente, a técnica de transcrição reversa acoplada à reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) tem sido utilizada para a detecção do genoma viral em amostras clínicas.

A presença do vírus da influenza tipo A pode ser confirmada utilizando-se oligonucleotídeos nucleoproteína ou matriz-específicos. A presença dos subtipos H5 e H7 também pode ser confirmada através de oligonucleotídeos H5-

ou H7 específicos. Por meio dessa técnica e com posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados, é possível diferenciar as cepas de alta e média patogenicidade. A presença de múltiplos aminoácidos básicos na região de clivagem da HA caracteriza as cepas de alta patogenicidade.

Após o isolamento, os isolados identificados como vírus da influenza devem ser testados para a determinação da sua patogenicidade. A patogenicidade é determinada de acordo com protocolos utilizados internacionalmente e descritos pela OIE. Os isolados virais serão considerados de alta virulência se: a) induzirem a morte em $\geq 75\%$ de oito aves com idade entre 4-8 semanas; b) induzirem a morte de $\leq 75\%$ das aves, mas forem dos subtipos H5 ou H7 e apresentarem os múltiplos aminoácidos básicos na região de clivagem da hemaglutinina; e c) induzirem a morte de uma a cinco aves e replicarem em cultivo celular sem a adição de tripsina.

6.3.6 Controle e profilaxia

As medidas de controle e profilaxia adotadas frente a surtos de influenza aviária variam de acordo com a legislação de cada país. Medidas diferenciadas também podem ser aplicadas considerando-se a patogenicidade da cepa infectante. Os procedimentos frente a surtos com cepas de média ou alta patogenicidade podem ser distintos. Nos países que enfrentaram essa situação em períodos recentes, o direcionamento geral tem sido a eliminação das aves infectadas e também de outras aves em contato. No entanto, em alguns casos, optou-se pelo controle pelo uso de vacinação emergencial. A Organização Internacional de Epizootias (OIE), Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS – WHO) apresentam medidas de prevenção e controle da influenza aviária internacionalmente nos seus respectivos endereços eletrônicos.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que as principais fontes do vírus para as aves domésticas são as aves silvestres e, num segundo momento, as próprias aves domésticas. Portanto, os pontos principais a serem observados para o controle dessa enfermidade são: primeiro, evitar a transmissão do vírus de aves silvestres para

aves domésticas e, segundo, evitar a propagação do vírus entre aves domésticas caso ocorra a introdução da infecção. De acordo com as recomendações técnicas, o controle deve ser realizado principalmente pelo uso de medidas rigorosas de biossegurança.

As aves infectadas excretam grande quantidade de vírus pelas fezes e secreções respiratórias. A transmissão ocorre principalmente pela exposição ao material orgânico contaminado, em equipamentos, água, alimento, cama, veículos, roupas e calçados de pessoas que estão em contato com os animais. A primeira etapa para evitar a transmissão do vírus é evitar o transporte de aves infectadas e de material orgânico potencialmente contaminado. Em caso de surtos, a interdição da propriedade contaminada é um procedimento compulsório.

Especialistas chamam a atenção para a rápida adoção de medidas de controle de focos causados por vírus de média patogenicidade como um dos procedimentos mais importantes para evitar o surgimento de cepas de alta patogenicidade. Como já mencionado, quanto maior for a circulação do vírus na população avícola, maiores serão as chances de ocorrerem alterações na patogenicidade desses vírus.

A vacinação contra a influenza aviária tem sido realizada em situações específicas em alguns países, mas a sua aplicação ainda é um ponto muito polêmico. O maior argumento contra a vacinação é comum a outras doenças de animais, ou seja, a impossibilidade de diferenciação entre animais vacinados e animais infectados pelo vírus de campo. Outro forte argumento contra a vacinação de aves é o de que algumas vacinas protegem contra os sinais clínicos, mas não protegem contra a infecção e excreção viral. Neste caso, os vírus poderiam seguir circulando e propiciar o surgimento de cepas altamente patogênicas.

A proteção vacinal contra o vírus da influenza é específica para o subtipo, e qualquer subtipo pode infectar as aves. Como seria muito difícil prever o subtipo que irá infectar determinada população avícola, a escolha do subtipo a ser incluído na vacina é mais um problema que restringe o uso da vacinação. Existe uma porção significativa da comunidade técnico-científica que é totalmen-

te contra a vacinação de aves, seja pelo risco que isto poderia representar para humanos, como pela dificuldade de controle dessas medidas.

O uso de vacinação tem sido considerado como uma alternativa sob duas condições: a vacinação profilática e vacinação emergencial. Segundo alguns especialistas, a vacinação profilática poderia ser realizada em áreas que apresentam alto risco de infecção pelos subtipos H5 e H7 ou, então, em regiões que estão sob risco de infecção com um subtipo conhecido. Em todos os casos, a vacinação deve ser considerada como um instrumento a mais a ser aplicado em conjunto com medidas de biossegurança e com o monitoramento da evolução da infecção. Para erradicar o vírus da influenza, o sistema de vacinação deve permitir a detecção do vírus de campo em um lote vacinado, caso ele esteja presente. Isso pode ser atingido utilizando-se tanto vacinas inativadas convencionais quanto vacinas recombinantes. As vacinas inativadas, com o mesmo subtipo do vírus de campo, permitem a detecção do vírus de campo através da introdução de aves sentinelas, não-vacinadas, dentro do lote vacinado. Estas aves são testadas regularmente para a detecção de uma eventual soroconversão, o que indicaria a circulação do vírus de campo naquela população. Esse sistema é aplicável no campo, mas é um pouco impraticável, uma vez que as aves sentinelas devem ser marcadas e facilmente reconhecidas. Esse método foi utilizado na Itália e é utilizado, atualmente, na vigilância da população de gansos vacinados e de patos na França.

Um sistema um pouco mais encorajador é baseado na detecção de anticorpos anti-NS1, que foi recentemente desenvolvido e pode ser utilizado com todas as vacinas inativadas. Esse sistema é baseado no fato de que a proteína NS1 é sintetizada apenas durante a replicação viral ativa e, por isso, raramente presente em vacinas inativadas. As aves vacinadas com essas vacinas irão desenvolver anticorpos apenas depois da exposição ao vírus de campo. Testes em campo estão em andamento em diferentes circunstâncias, e os resultados precisam ser validados antes desse sistema ser recomendado.

Até agora, o único sistema que permite a detecção do vírus de campo na população vacinada que resulta na erradicação baseia-se na vacinação heteróloga e é conhecido como DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*). Esse sistema foi desenvolvido para os programas de erradicação das diferentes cepas de vírus de média patogenicidade do subtipo H7. A vacina utilizada contém o vírus com a mesma HA, porém com uma NA diferente, como o vírus de campo. Essa estratégia de vacinação permite a detecção dos anticorpos da neuraminidase específicos contra o vírus de campo. Por exemplo, se a cepa do vírus de campo em circulação é um H7N1, a vacina utilizada deverá ser um H7N3 ou uma das outras sete combinações possíveis de NA. O monitoramento sorológico baseado na proteína N3 confirmará que o lote foi vacinado, e o baseado na proteína N1 confirmará que a ave foi infectada com o vírus de campo. As aves que formam vacinadas e depois infectadas também são detectadas.

A vacinação contra o vírus da influenza aviária já foi utilizada em países diferentes com sucesso variável. Vacinas inativadas e recombinantes foram usadas no México, na Itália, no Paquistão e nos EUA para controlar o vírus da influenza de média patogenicidade. Antes do surto causado pelo vírus de alta patogenicidade H5N1 na Ásia sudeste, algumas tentativas foram relatadas para controlar surtos causados por vírus de alta patogenicidade através da vacinação: surto por H5N2 no México (1994); H7N1 na Itália (2000), H7N3 no Paquistão (2003).

As práticas inadequadas de biossegurança ou de vacinação podem conduzir à transmissão viral entre lotes e a seleção de variantes que exibem a *antigenic drift*. Os vírus H5N2 circulantes no México apresentaram *antigenic drift* resultando uma baixa identidade com as cepas vacinais. O uso intenso de vacinas no México resultou na emergência de variantes antigênicas, que escapam da resposta imune induzida pela vacina. O México tem vacinado as aves comerciais desde o surto de alta patogenicidade, em 1994, sem nunca aplicar o princípio DIVA. Embora nenhum vírus de alta patogenicidade tenha sido relatado desde

o início da campanha de vacinação, os vírus de média patogenicidade continuam em circulação. Por outro lado, em Hong Kong, diversas campanhas de vacinação foram realizadas após o surto de H5N1 (1997), conseguindo diminuir significativamente a ocorrência do vírus da influenza. A vacinação sistemática das aves importadas, assim como outras medidas de biossegurança, são importantes para evitar novos surtos.

No Brasil, a influenza aviária é uma doença considerada exótica, e o procedimento determinado pelo Ministério da Agricultura, no caso de focos, é a erradicação do vírus pela destruição das aves infectadas. Os casos suspeitos da doença devem ser comunicados aos órgãos de vigilância oficiais (Inspetorias Veterinárias), que enviarão médicos veterinários para realizar a coleta de material de animais suspeitos. Esse material será enviado para um laboratório credenciado pelo Ministério para realizar o diagnóstico (LARA – Campinas; EMBRAPA Suínos e Aves). No caso da confirmação do resultado positivo, serão tomadas as medidas descritas no manual do Programa Nacional de Sanidade Avícola (Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>).

6.4 Influenza em aves silvestres

Aparentemente as aves silvestres, principalmente as aquáticas e migratórias, são os principais reservatórios dos vírus da influenza aviária circulantes no mundo. Cepas de média patogenicidade já foram isoladas de, aproximadamente, 100 espécies de aves. Nessas espécies, vírus com os 16 tipos de HA e com os nove possíveis tipos de NA circulam em aparente equilíbrio com os seus hospedeiros. As aves aquáticas pertencentes às ordens *Anseriforme* e *Chradriiforme* representam o maior reservatório natural desses vírus. O vírus já foi isolado também de aves terrestres, mas essas espécies parecem não possuir um papel maior na manutenção do vírus na natureza. Na maioria dos casos, o vírus influenza infecta e se perpetua nessas espécies sem causar doença, ou seja, produz infecções predominantemente subclínicas. Outro aspecto interessante na infecção pelo vírus da influenza nessas espécies é que o vírus permanece geneticamente estável, com poucas mutações, por longos períodos de tempo.

Isso indica que o vírus atingiu um equilíbrio com o seu hospedeiro natural.

Os patos, gansos e cisnes estão classificados dentro da ordem *Anseriforme*, enquanto gaivotas, andorinhas-do-mar e aves pernaltas estão classificados na ordem *Chradriiforme*. Outras aves silvestres das quais o vírus já foi isolado são: faisões e perdizes (*Galliformes*), falcões (*Falconiformes*), garças e íbis (*Ciconiiformes*), tentilhões e *weaver-birds* (*Passeriformes*), cormorão (*Pelicaniformes*), pombos (*Columbiformes*), pica-paus (*Piciformes*), mergulhões (*Podicipediformes*). A infecção pelo vírus da influenza já foi descrita também em algumas espécies silvestres que são criadas como animais de estimação, como os papagaios, cacatuas e periquitos (*Psittaciformes*). Além disso, espécies silvestres, atualmente criadas como animais de produção, como emas (*Rheiformes*) e avestruzes (*Struthioniformes*), também podem ser infectadas naturalmente.

O primeiro caso de isolamento do vírus da influenza de aves silvestres foi realizado na África do Sul, no ano de 1961. Nesse caso, uma cepa de alta virulência causou doença e morte em um grande número de andorinhas-do-mar naquele país. Apesar deste isolamento inicial, as evidências sugerem que cepas de alta patogenicidade não circulam geralmente entre as aves silvestres, uma vez que os demais isolamentos realizados a partir de aves silvestres resultaram na detecção das cepas de patogenicidade média. Com a exceção de alguns casos, em que provavelmente aves silvestres se infectaram a partir de aves domésticas, as cepas altamente patogênicas somente foram novamente detectadas causando doença em aves silvestres no ano de 2002, em gansos na China (cepa H5N1 que atualmente está causando epidemia na Eurásia). Além de ser patogênica para aves domésticas, humanos e outras espécies de mamíferos, o vírus H5N1 também são patogênicos para algumas espécies silvestres.

Várias espécies de aves das quais o vírus H5N1 foi isolado pertencem a espécies que realizam longas migrações em diferentes épocas do ano, principalmente no período de inverno, nas regiões localizadas no Hemisfério Norte. As rotas de migração podem diferir entre as espécies, compreendendo desde curtos movimentos locais até migrações intercontinentais. Essas rotas

migratórias não estão totalmente elucidadas, e um dos aspectos preocupantes é a possibilidade de pontos comuns de parada existentes para as espécies, o que permitiria um contato entre um grande número de aves da mesma e de diferentes espécies. Este contato poderia facilitar ao vírus ser carregado a regiões novas onde ainda não circula.

Estudos realizados em patos silvestres no Canadá demonstraram que a perpetuação do vírus influenza nessas aves relaciona-se com a passagem do vírus de aves adultas para aves jovens em lagos, antes da migração. Um dos aspectos relevantes é a grande quantidade de vírus que é excretado nas fezes das aves. Essas fezes contaminam principalmente a água de lagos e lagoas, onde um grande número dessas aves permanece, facilitando a transmissão pela rota fecal/oral ou fecal/cloacal na superfície da água. Ficou determinado que o vírus permanece viável por um período de 4 dias a 22°C e pelo período de 30 dias a 0°C.

6.5 Vírus da influenza H5N1

A grande maioria dos vírus da influenza A que circulam nas populações silvestres de aves aquáticas e migratórias é apatogênica e permanece razoavelmente estável geneticamente ao longo do tempo nessas espécies. Mesmo os subtipos H5 e H7 eram considerados benignos para os seus hospedeiros naturais até há pouco tempo. No entanto, a transmissão desses vírus para outros hospedeiros – mamíferos ou aves domésticas, por exemplo – é seguida de rápida evolução genética e freqüentemente por aumento na patogenicidade e virulência.

O vírus da influenza aviária pode, ocasionalmente, tornar-se patogênico para humanos mediante dois mecanismos genéticos principais: reassortimento, que se caracteriza pela troca de segmentos genômicos (genes) entre dois vírus durante uma infecção mista, ou através de mutações nos diferentes genes internos que permitam a infecção de células humanas. As grandes pandemias de influenza humana, ocorridas no século XX, tiveram o envolvimento de vírus de origem avícola (ver Figura 28.7). Esses vírus sofreram

reassortimento ao infectar células de outro mamífero (geralmente suíno), concomitantemente com vírus de origem humana nas pandemias de 1957 e 1968. Estudos recentes de Biologia Molecular indicam que a pandemia de influenza de 1918, conhecida como gripe espanhola, foi causada por um vírus aviário que teria sofrido algumas mutações e se adaptado ao organismo humano, sem o processo de reassortimento.

Até 1997, não havia evidência de que vírus do subtipo H5 poderiam infectar e causar doença grave em pessoas. Até então, apenas três casos de transmissão direta de vírus aviários para humanos haviam sido relatados, todos eles envolvendo vírus do subtipo H7. Por isso, não se considerava que os vírus da influenza aviária poderiam representar risco à saúde pública. Acreditava-se que a diferença de especificidade de receptores para os vírus aviários e humanos se constituía em uma eficiente barreira que limitava a transmissão de vírus entre aves e pessoas. Este conceito sofreu uma mudança drástica com o surgimento dos vírus H5N1, que foram transmitidos diretamente de aves para humanos, em 1997, em Hong Kong, resultando na morte de seis das 18 pessoas infectadas.

A origem desses vírus ocorreu poucos anos antes, quando surgiram os primeiros vírus desse subtipo que foram capazes de, inicialmente, causar doença e mortalidade em gansos e, posteriormente, serem transmitidos a humanos. Esses vírus de gansos adquiriram segmentos genômicos de proteínas internas e não-estruturais de vírus de perdizes, e o gene da NA de um vírus de marrecos/patos e, posteriormente, disseminaram-se nos mercados de aves em Hong Kong. A erradicação de toda a população de galinhas domésticas de Hong Kong foi capaz de conter a epidemia.

No entanto, outros vírus resultantes de reassortimento continuaram a ser gerados e disseminados a partir das populações de gansos e marrecos/patos silvestres, contendo a mesma H5 e diferentes combinações de genes/proteínas internas. Os vírus H5N1 continuaram a evoluir e, em 2002, um subtipo único, denominado genótipo Z, foi responsável por grande mortalidade de aves aquáticas domésticas e silvestres em Hong Kong.

Este vírus continuou a circular de forma endêmica no Sul da China, principalmente em patos e marrecos domésticos. No final de 2003 e início de 2004, foram relatados surtos de infecções pelo H5N1 simultaneamente em vários países asiáticos. O vírus foi detectado no Vietnã, Tailândia, Indonésia, Camboja, Laos, Coréia, Japão e China. Os surtos foram aparentemente controlados, mas, em agosto de 2004, o vírus foi detectado na Malásia.

Vários estudos moleculares do vírus H5N1 foram realizados no período de 2000-2004 de isolados humanos e de aves nos países asiáticos. O sequenciamento desses isolados demonstrou que uma série de ressортimentos, envolvendo o vírus inicialmente detectado em gansos, deu origem a um genótipo de H5N1 dominante (genótipo Z) entre galinhas e perus. A evolução do vírus H5N1 potencializou sua virulência e sua expansão entre hospedeiros susceptíveis. Foi observado um aumento da virulência para espécies silvestres e também uma maior letalidade em camundongos e furões infectados experimentalmente. O vírus tornou-se infeccioso para mamíferos, causando mortes e sendo transmitido entre felinos selvagens como tigres e leopardos, e também entre gatos domésticos.

Surtos do H5N1 foram relatados em aves migratórias na China e na Mongólia em 2005, e o vírus foi detectado principalmente em aves oriundas do Lago Qinghai, localizado no Oeste da China. A propagação do vírus através dessas aves para outras regiões a oeste e sul é considerada uma possibilidade. Nesse mesmo ano, o vírus foi isolado de cisnes na Croácia e, posteriormente, em 2006, no Irã, Azerbaijão, Casaquistão, Geórgia e em outros 20 países europeus.

O vírus propagou-se da Ásia para a Europa e África, causando a enfermidade e levando à destruição de mais de 200 milhões de aves em vários países. Até abril de 2007, a presença do H5N1 já havia sido relatada em quarenta países desses três continentes. Ainda de acordo com o relato da Organização Mundial de Saúde (OMS-WHO) de abril de 2007, 291 já foram infectadas pelo H5N1 e ocorreram 172 óbitos com comprovação laboratorial da etiologia.

Até início de 2007, apesar das centenas de casos humanos registrados e dos freqüentes registros de doença causada por vírus H5N1 em aves silvestres e domésticas de vários países asiáticos, África, Oriente Médio e Europa Oriental, não havia evidência de transmissão do vírus entre pessoas. Ou seja, os casos de infecção humana foram originados da exposição direta ou indireta de pessoas a aves infectadas. Isto explicava porque os casos humanos se restringiam a poucas pessoas, geralmente membros de uma mesma família. A capacidade dos vírus aviários serem transmitidos entre pessoas e de replicar eficientemente no trato respiratório de humanos está associada com duas proteínas e funções principais: HA e PB2. Alterações na HA permitem ao vírus se ligar em receptores que contêm ácido siálico com ligação $\alpha 2,6$, que estão presentes no epitélio do trato respiratório superior e, assim, iniciar a infecção. Mutações específicas na PB2 (E para K na posição 627) aumentam a capacidade do vírus replicar em células de mamíferos e conferem uma vantagem para a replicação sob as temperaturas mais baixas do trato respiratório superior. Essas duas alterações são provavelmente necessárias, porém insuficientes para a geração de vírus H5N1 pandêmicos.

A grande preocupação de autoridades sanitárias de todo o mundo é a de que este vírus eventualmente adquira a capacidade de ser transmitido entre pessoas – como ocorre com os vírus da influenza A humanos – podendo, então, disseminar-se rapidamente na população humana e causar uma pandemia mundial. Esta preocupação reveste-se de especial significado pela severidade da doença causada pelo H5N1 em humanos.

6.6 Influenza em cães, felinos e outros mamíferos

A constante evolução do vírus da influenza, por mutações, deleções e ressортimento, tem permitido a adaptação a novos hospedeiros e a produção de doença severa em animais e humanos. A primeira descrição da infecção pelo vírus da influenza em cães (H3N2) data de 1975-1976,

sem a produção de sinais clínicos severos. Porém, em 2005, foi relatada a infecção de cães pelo vírus da influenza equina H3N8, ocorrendo casos fatais da doença nos EUA. Em felinos domésticos, a infecção experimental com o H3N2 de humanos, H7N3 de perus e H7N7 de focas (*Phoc vitulina*) foi demonstrada nos anos 1970 e 1980, observando-se somente hipertermia e excreção de vírus. No entanto, entre 2003 e 2007, foram relatados casos de infecção pelo H5N1 em felinos domésticos e selvagens, resultando em mortalidade.

Até há pouco tempo acreditava-se que os cães e gatos eram resistentes à doença causada pelos vírus da influenza tipo A. Porém, felídeos e canídeos têm sido, repetidas vezes, demonstrados susceptíveis à infecção com esses vírus.

6.6.1 Epidemiologia

As primeiras descrições de infecção pelo H5N1 em gatos domésticos foram realizadas na Tailândia, Alemanha, Áustria, China, Iraque e Indonésia, durante surtos de influenza aviária. Felinos selvagens também são susceptíveis à infecção. Dois tigres (*Panthera tigris*) e dois leopardos (*P. pardus*) morreram após contraírem a infecção por ingestão de carne crua de aves contaminadas. Em um zoológico da Tailândia, 147 tigres morreram ou foram abatidos após apresentarem sinais clínicos de influenza, e foi possível demonstrar a transmissão horizontal do vírus entre os tigres. Em 2005, três gatos *civets* morreram no Vietnã após a infecção com o H5N1. Furões também são susceptíveis à infecção experimental e podem servir de modelo para estudos com o H5N1. Estes animais desenvolvem sinais clínicos de infecção respiratória e excretam o vírus em secreções nasais. O H3N2 também pode replicar em furões, porém apresenta menor patogenicidade. Felinos e furões podem transmitir horizontalmente o H5N1. Essas espécies são criadas como animais domésticos e possuem contato direto com pessoas, podendo servir como uma fonte eventual de vírus para humanos.

A infecção pelo H5N1 possui importância pelas taxas elevadas de mortalidade e letalidade em animais, além de possuir potencial zoonótico. Um estudo sorológico, realizado em Bangkok,

demonstrou 160 cães e oito gatos soropositivos para o H5N1, indicando que esses animais foram infectados naturalmente. Um caso fatal de H5N1 em um cão que ingeriu a carcaça de um pato infectado na Tailândia foi relatado em 2006. As mutações e ressортimentos são comuns nos vírus da influenza tipo A, alertando para a possível transmissão entre espécies.

Além do H5N1, os cães são susceptíveis à infecção pelos vírus H3N2 de humanos e o H3N8 de equinos. Crawford et al. (2005) demonstraram a ocorrência de doença respiratória aguda severa em cães de corrida da raça *greyhound* na Flórida, EUA. Estudos retrospectivos com amostras de soro coletadas de cães de corrida entre 2000 e 2003 demonstraram que a infecção já ocorria naquele período. Amostras de soro coletadas de cães em hospitais veterinários e canis em outras regiões do país comprovaram a disseminação do agente, a expansão geográfica e a persistência do vírus durante anos nessa espécie. A eficiente transmissão e adaptação do vírus aos cães sugerem que este agente pode se tornar enzoótico nessa espécie.

A infecção pelos vírus da influenza tipo A em canídeos e felídeos pode ocorrer por contato direto com aves infectadas ou, ainda, por contato indireto com uma fonte comum, contaminada com fezes de aves (H5N1), ou com secreção nasal de equinos (H3N8). A transmissão por carne crua de aves é relatada principalmente para felinos. Nos felinos infectados, o H5N1 é encontrado na saliva, urina e/ou fezes.

A evidência de infecção pelos vírus da influenza tipo A em animais domésticos, que possuem amplo contato com humanos, é motivo de preocupação para a saúde pública, pela possibilidade desses animais servirem como uma fonte adicional de vírus, permitindo a transmissão a outros mamíferos e aumentando o risco de uma pandemia de influenza humana.

6.6.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

O período de incubação que se segue à infecção geralmente é curto, entre dois e cinco dias em cães, tigres e gatos domésticos. As vias de in-

fecção são os tratos respiratório e digestório, e a replicação inicial ocorre nos pneumócitos tipo II nos alvéolos pulmonares. Eventualmente, o vírus atinge os rins, fígado, coração, encéfalo, intestino grosso, glândula adrenal, baço e pâncreas de felinos, o que demonstra a ocorrência de viremia. A excreção de vírus inicia no terceiro dia após a infecção e permanece por mais de sete dias nos animais que sobrevivem. As mortes geralmente devem-se à hemorragia e necrose multifocal em diferentes órgãos, associada com lesões pulmonares.

Os sinais clínicos relatados em gatos e tigres após a infecção com o H5N1 são de hipertermia, depressão, protusão da terceira pálpebra, conjuntivite, dificuldade respiratória, descarga nasal serosanguinolenta e icterícia em casos de hemorragia difusa. Sinais neurológicos, incluindo convulsões e ataxia, são consistentes com lesões no encéfalo. A morte ocorre dois dias após o início dos sinais em casos severos, porém infecções subclínicas também são relatadas. As infecções por outros vírus da influenza tipo A em gatos produz hipertermia e sinais brandos de infecção respiratória, com excreção de vírus pela secreção nasal.

Cães infectados com o H3N8 podem apresentar doença respiratória aguda, caracterizada por sinais brandos, como hipertermia e tosse por 10 a 14 dias, ou morte hiperaguda associada com hemorragias no trato respiratório. A taxa de mortalidade foi de 36% em um surto de H3N8 em cães de corrida nos EUA. Já o H5N1 pode ser detectado em amostras de pulmão, fígado e rins de cães infectados, demonstrando que esse vírus pode se disseminar sistemicamente nessa espécie.

Na necropsia, tigres e gatos domésticos infectados com o H5N1 apresentam congestão e hemorragias petequiais nos pulmões, exsudato serosanguinolento na traquéia e nos brônquios, efusão pleural, congestão no encéfalo, conjuntivite, congestão renal e hemorragia intestinal. Microscopicamente, observam-se meningoencefalite não-suprativa, gliose, vasculite e congestão no encéfalo, necrose multifocal no fígado, tubulonefrite, depleção linfóide no baço, edema e hemorragia severa nos pulmões e outros órgãos. Há, ainda, perda do epitélio alveolar e bronquiolar com infiltrado de células inflamatórias.

Os cães que morrem após a infecção aguda pelo H3N8 apresentam traqueíte, bronquite e bronquiolite, infiltrado de células inflamatórias e broncopneumonia supurativa. Um cão infectado pelo H5N1 apresentava congestão e edema pulmonar, congestão no baço, fígado e rins; e, na microscopia pneumonia intersticial, infiltrado de células inflamatórias, necrose hepática, nefrite e degeneração tubular.

6.6.3 Diagnóstico

A suspeita clínica de infecção pelo vírus da influenza pode ser confirmada pela inoculação de secreções nasais, orofaríngeas, amostras fecais ou suspensões de tecidos suspeitos em células MDCK ou, ainda, no saco alantóide de ovos embrionados de 10 dias. Clinicamente, a infecção em cães é muito semelhante aos sinais observados na tosse dos canis, porém a ocorrência de hemorragias e sinais mais severos pode diferenciar a etiologia da doença. Felinos com influenza apresentam sinais semelhantes aos apresentados na síndrome do trato respiratório superior.

A confirmação laboratorial da infecção pelos vírus da influenza pode ser realizada por IHQ, hemaglutinação associada com HI e RT-PCR em tempo real. Testes sorológicos como HI e soro-neutralização (SN) também podem ser utilizados.

6.6.4 Controle e prevenção

A principal forma de prevenir a doença é evitar o contato de cães e gatos com aves e fezes de animais contaminados (no caso do H5N1) ou com equinos e/ou utensílios e instalações (no caso do H3N8), nas regiões onde ocorrem surtos de influenza aviária ou equina. A Organização Mundial para Alimentos e Agricultura (FAO) organizou uma série de recomendações para os proprietários de animais de companhia em áreas onde ocorrem surtos de gripe aviária. Em zoológicos, felinos selvagens devem ser alimentados com carne de aves sabidamente negativas para o vírus. Outros animais selvagens e marinhos, mustelídeos, suínos e gatos *civets* também podem ser infectados pelo H5N1 e servir como fonte de transmissão.

As vacinas contra o H3N8 utilizadas em eqüinos podem ser adaptadas para o uso em cães. Uma vacina recombinante, contendo o poxvírus do canário como vetor e expressando a HA do vírus, foi testada e induziu títulos médios a altos de anticorpos em cães, protegendo esses animais contra a doença causada pelo H3N8.

Uma vacina recombinante, com a inserção do DNA complementar (cDNA) do gene da HA do H5N1 em um adenovírus canino tipo 2 foi desenvolvida e testada na China. Títulos de anticorpos inibidores de hemaglutinação de 8 e 16 foram produzidos após a imunização experimental de felinos selvagens e domésticos, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da influenza aviária H5N1 em animais domésticos e selvagens.

7 Bibliografia consultada

- ALEXANDER, D.J. A review of avian influenza in different bird species. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.3-13, 2000.
- ALEXANDER, D.J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, in press, 2006.
- BECKER, W.B. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961. **The Journal of Hygiene**, v.64, p.309-320, 1966.
- BELSHE, R.B. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. **The New England Journal of Medicine**, v.353, p.2209-2211, 2005.
- CAPUA, I.; CATOLI, G.; MARANGON, S. DIVA--a vaccination strategy enabling the detection of field exposure to avian influenza. **Developments in Biologicals**, v.119, p.229-233, 2004.
- CAPUA, I.; MARANGON, S. Control of avian influenza in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1319-1324, 2006.
- CARTER, G.R.; WISE, D.J.; FLORES, E.F. Orthomyxoviridae. In: CARTER, G.R., WISE, D.J., FLORES, E.F. (Eds). A concise review of veterinary virology. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 12 nov. 2006.
- CDC. **Key facts about swine influenza (swine flu)**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/flu/swine/>. Acesso em: 31 jan. 2007.
- CHAMBERS, T.M.; HOLLAND JR, R.E.; LAI, A.C.K. Equine influenza: current veterinary perspectives, part 1. **Equine Practice**, v.17, p.19-30, 1995.
- CHEN, H. et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. **Nature**, v.436, p.191-192, 2005.
- CRAWFORD, P.C. et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. **Science**, v.310, p.482-485, 2005.
- CUNHA, R.G. Isolamento de amostras do vírus da influenza eqüina A/Equi 2 no Estado da Guanabara. **Revista Brasileira de Biologia**, v.30, p.491-498, 1970.
- CUNHA, R.G.; PAGANO, M.C.C. Comparação antigênica de três amostras de vírus da influenza eqüina A/Equi 2, isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.13, p.41-44, 1993.
- DE JONG, M.D.; HIEN, T.T. Avian influenza A (H5N1). **Journal of Clinical Virology**, v.35, p.2-13, 2006.
- EASTERDAY, B.C.; VAN REETH, K. Swine Influenza. In: STRAW, B.E. et al. (Eds). **Diseases of swine**. 8. ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999. Cap.22, p.277-290.
- ENSERINK, M.; KAISER, J. Avian flu finds new mammal hosts. **Science**, v.305, p.1385, 2004.
- FAO. **H5N1 in cats – 8 March 2006**. Disponível em: http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/avian_cats.html. Acesso em: 31 jan. 2007.
- GAO, Y.W. et al. Construction and experimental immunity of recombinant replication-competent canine adenovirus type 2 expressing hemagglutinin gene of H5N1 subtype tiger influenza virus. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.46, p.297-300, 2006.
- HINSHAW, V.S.; WEBSTER, R.G.; TURNER, B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. **Canadian Journal of Microbiology**, v.26, p.622-629, 1980.
- JUNG, K.; HA, Y.; CHAE, C. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, p.179-184, 2005.
- KARACA, K. et al. Evaluation of the ability of canarypox-vectored equine influenza virus vaccines to induce humoral immune responses against canine influenza viruses in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, p.208-212, 2007.
- KEAWCHAROEN, J. et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.2189-2191, 2004.
- KODIHALLI, S. et al. Effect of avian influenza virus infection on the phagocytic function of systemic phagocytes and pulmonary macrophages of turkeys. **Avian Diseases**, v.38, p.93-102, 1994.
- KUIKEN, T. et al. Avian H5N1 influenza in cats. **Science**, v.306, p.241, 2004.
- LAUDERT, E. et al. Biological and molecular characterization of H13N2 influenza type A viruses isolated from turkeys and surface water. **Avian Diseases**, v.37, p.793-799, 1993.
- MA, W. et al. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States. **Journal of Virology**, v.80, p.5092-5096, 2006.

- MURPHY, F.A. et al. Orthomyxoviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. Cap.30, p.459-468.
- NEWTON, J.R.; DALY, J.M.; WOOD, J.L.N. Immune Response to Influenza and Implications for Vaccines Development. In: AINSWORTH, D.M. et al. (Eds). **Third World Equine Symposium**. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service. Disponível em: Internet <http://www.ivis.org>. Acesso em: 12 nov. 2006.
- OLSEN, B. et al. Global patterns of influenza a virus in wild birds. **Science**, v.312, p.384-388, 2006.
- OLSEN, C.W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. **Virus Research**, v.85, p.199-210, 2002.
- PAGANO, M.C.; PASSOS, W.S.; CUNHA, R.G. Anticorpos inibidores de hemoaglutinação para os vírus de influenza eqüina em soros de eqüídeos de várias regiões do Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.7, p.194-198, 1985.
- PENA, L.J. et al. Levantamento soro-epidemiológico da infecção pelo vírus da anemia infecciosa eqüina, da influenza eqüina-2 e do herpesvírus equino-1 em rebanhos do sul do Estado do Pará, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.43, p.537-542, 2006.
- PERDUE, M.L.; SUAREZ, D.L. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.77-86, 2000.
- PEREZ, D.R.; SORRELL, E.M.; DONIS, R.O. Avian influenza: an omnipresent pandemic threat. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.24, p.208-216, 2005.
- PERKINS, L.E.; SWAYNE, D.E. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. **Veterinary Pathology**, v.38, p.149-164, 2001.
- SCHAEFER, R.; BRENTANO, L. **Influenza suína: o papel epidemiológico dos suínos nas infecções causadas pelo vírus Influenza**. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves, 2005. 21p.
- SEO, S.H.; WEBSTER, R.G. Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. **Journal of Virology**, v.75, p.2516-2525, 2001.
- SONGSERM, T. et al. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.681-683, 2006.
- SONGSERM, T. et al. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1744-1747, 2006.
- STALLKNECHT, D.E. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN INFLUENZA, 4th 1998, Athens, GA. **Proceedings...** Athens, GA: US Animal Health Association, 1998. p.61-69.
- STALLKNECHT, D.E.; SHANE, S.M. Host range of avian influenza virus in free-living birds. **Veterinary Research Communications**, v.12, p.125-141, 1988.
- SUAREZ, D.L.; SCHULTZ-CHERRY, S. Immunology of avian influenza virus: a review. **Developmental and Comparative Immunology**, v.24, p.269-283, 2000.
- SWAYNE, D.E.; SENNE, D.A.; BEARD, C.W. Avian Influenza. In: SWAYNE, D.E. et al (Eds). **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. Kennett Square, PA: American Association of Avian Pathologists, 1998. Cap.29, p.150-155.
- TAUBENBERGER, J.K. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. **Nature**, v.437, p.889-893, 2005.
- THANAWONGMUWECH, R. et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.699-701, 2005.
- THIRY, E. et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.25-31, 2007.
- TOLLIS, M.; DI TRANI, L. Recent developments in avian influenza research: epidemiology and immunoprophylaxis. **Veterinary Journal**, v.164, p.202-215, 2002.
- TUMPEY, T.M. et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. **Science**, v.310, p.77-80, 2005.
- VAN REETH, K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. **Veterinary Research**, v.38, p.243-260, 2007.
- WEBSTER, R.G. et al. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.3-8, 2006.
- WEBSTER, R.G. et al. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. **Virology**, v.84, p.268-278, 1978.
- WEIBLEN, R. Influenza Eqüina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. p.120-125.
- WILEY, D.C.; WILSON, I.A.; SKEHEL, J.J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. **Nature**, v.289, p.373-378, 1981.
- WILSON, W.D. Equine Influenza. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v.9, p.257-282, 1993.
- YATES, P.; MUMFORD, J.A. Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.173-177, 2000.
- ZITZOW, L.A. et al. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. **Journal of Virology**, v.76, p.4420-4429, 2002.

1 Introdução	757
2 Classificação	757
3 Estrutura do vírion e do genoma	757
4 Replicação	759
4.1 O ciclo replicativo	759
4.2 Expressão gênica e replicação do genoma	760
5 Biologia e patogenia	762
6 Buniavírus de interesse veterinário	762
6.1 Vírus da febre do vale Rift	762
6.1.1 Epidemiologia	762
6.1.2 Patogenia e sinais clínicos	764
6.1.3 Diagnóstico	765
6.1.4 Tratamento	765
6.1.5 Controle e profilaxia	765
6.2 Vírus da doença de Akabane	765
6.3 Hantavírus	767
6.4 Vírus da doença das ovelhas de Nairobi	769
6.5 Febre hemorrágica da Criméia-Congo	770
7 Bibliografia consultada	771

¹ Mariana Sá e Silva colaborou com a seção 6.2 (Hantavírus), e Eduardo Furtado Flores com as seções 6.4 (Doença das ovelhas de Nairobi) e 6.5 (Febre hemorrágica da Criméia-Congo).

1 Introdução

A família *Bunyaviridae* contém o maior número de vírus animais, abrigando centenas de espécies virais isoladas principalmente de insetos. Os vírions são grandes, envelopados e possuem como genoma três moléculas de RNA de polaridade negativa. A maioria desses vírus foi isolada de insetos ou de animais silvestres, sem estarem necessariamente associados com doença. Alguns bunivírus causam doença severa em humanos e vários deles são zoonóticos. Dos cinco gêneros da família, apenas os membros do gênero *Hantavirus* não são transmitidos por insetos, os demais são arbovírus. Este gênero abriga o hantavírus, um vírus zoonótico cujos hospedeiros naturais são roedores silvestres. Em humanos, a hantavirose se manifesta sob duas formas, por apresentar características epidemiológicas e clínicas distintas. No sudeste asiático, a doença é endêmica e manifesta-se primariamente por insuficiência renal aguda, com alta morbidade e baixa mortalidade. Nas Américas, a doença apresenta ocorrência esporádica e se manifesta por insuficiência respiratória aguda, com altos índices de letalidade.

No Brasil, já foram isoladas dezenas de vírus da família *Bunyaviridae*. Do ponto de vista clínico e epidemiológico, o mais importante é o vírus Oropouche, que está associado com epidemias na região amazônica. Esse vírus infecta primariamente humanos e, nessa região, o número de casos notificados é superado somente pela dengue, reforçando a sua importância. A enfermidade é conhecida como febre do Oropouche e é caracterizada por febre, cefaléia, mialgias, artralgias, anorexia, tonturas, calafrios e fotofobia. Menos frequentemente, a infecção pode cursar com sinais neurológicos. Este vírus se mantém na natureza através de dois ciclos: um urbano e outro silvestre. Embora no Brasil o mais importante vírus dessa família seja o Oropouche, deve-se salientar que, para os animais, o mais importante e patogênico membro da *Bunyaviridae* é o vírus da febre do vale Rift (RVFV), agente restrito praticamente ao continente africano.

2 Classificação

A família *Bunyaviridae* compreende mais de 300 vírus agrupados em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Tospovirus*. Vários membros dessa família estão associados com doenças hemorrágicas severas, como o vírus da febre do vale Rift (*Phlebovirus*), vírus da febre hemorrágica da Criméia-Congo (*Criméan-Congo hemorrhagic fever virus*, um *Nairovirus*), Hantaan, *Sin Nombre* e outros vírus relacionados (*Hantavirus*) e, mais recentemente, a Garissa, cujo agente identificado é o vírus Ngari (*Orthobunyavirus*). O gênero *Tospovirus* abriga somente vírus de plantas. Cada gênero da família *Bunyaviridae* inclui múltiplos sorotipos. Com exceção dos hantavírus, os vírus dos outros quatro gêneros são arbovírus, ou seja, são transmitidos por vetores (mosquitos, flebótomos ou carrapatos). Os hantavírus infectam naturalmente roedores silvestres e são transmitidos por contato direto ou indireto, ou, ainda, pela inalação de aerossóis oriundos das excreções destes animais.

3 Estrutura do vírion e do genoma

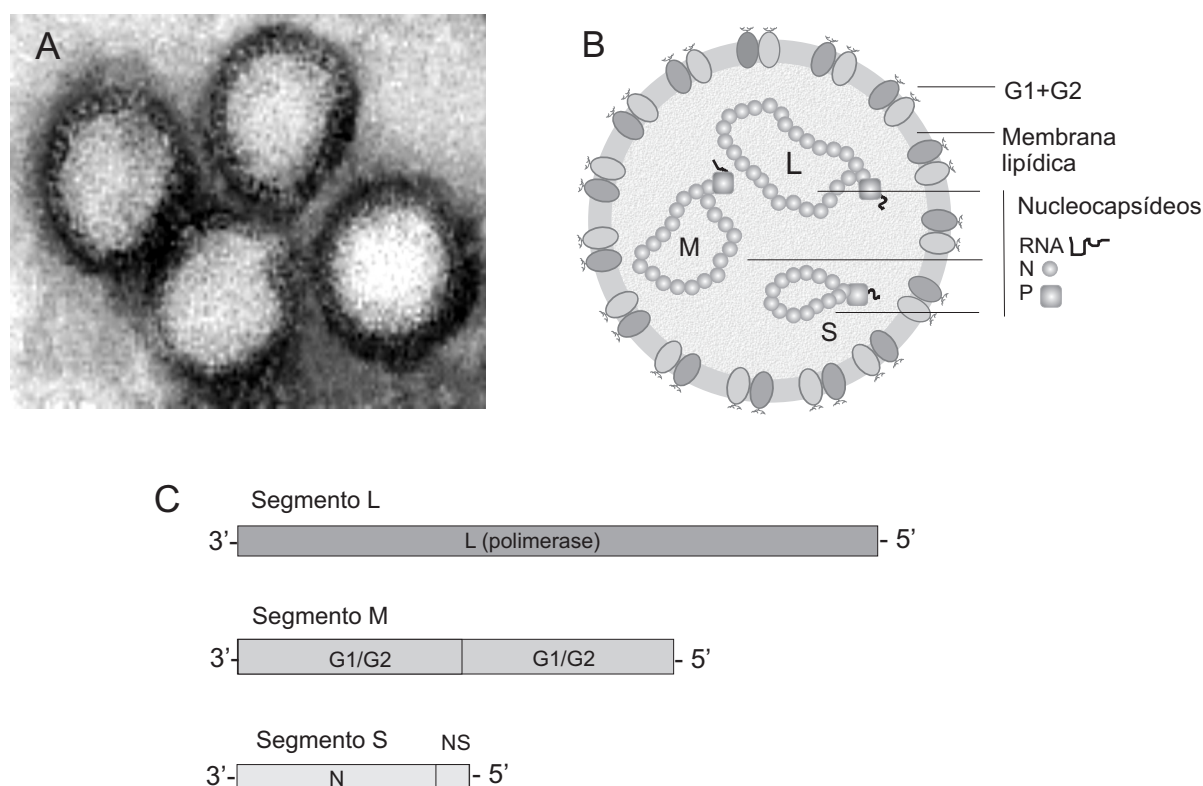
Os vírions dessa família são, aproximadamente, esféricos e envelopados, com 80 a 120 nm de diâmetro. A superfície do envelope possui projeções de 5 a 10 nm, formadas pelas glicoproteínas G1 e G2. O interior dos vírions contém três nucleocapsídeos de simetria helicoidal, cada um deles composto por um segmento de RNA conjugado com proteínas (proteína N + polimerase L) (Figura 29.1). A composição química dos vírus foi estimada em 2% de RNA, 58% de proteínas, 33% de lipídios e 7% de carboidratos.

Os bunivírus possuem um genoma segmentado, composto por três moléculas de RNA de fita simples e polaridade negativa. Em dois gêneros (*Phlebovirus* e *Tospovirus*), um desses segmentos possui a estratégia *ambissense* de expressão. A extensão dos três segmentos varia entre os diferentes gêneros. Os dois segmentos de polaridade negativa são denominados L (*large* =

grande), com 6.875 nucleotídeos (nt) e M (*medium* = médio), com 4.458 nt (estes números se referem ao vírus bunyawera). O terceiro segmento, *ambisense* em alguns gêneros, é denominado S (*small* = pequeno) e possui 961 nt. Sequências de nucleotídeos complementares entre si estão localizadas nas extremidades 5' e 3' dos RNA genômicos. Essa complementaridade permite o pareamento entre bases e a formação de ligações estáveis não covalentes, conferindo a esses segmentos a topologia circular (Figura 29.1). Deve-se ressaltar que esses segmentos não são contínuos – e, portanto, não se constituem em genomas verdadeiramente circulares – apenas adotam essa topologia pelo pareamento das extremidades. Sequências localizadas próximas às extremidades dos RNA genômicos também servem como sítios de reconhe-

cimento para a polimerase viral (replicase) nos processos de transcrição e replicação.

Os vírions contêm algumas cópias da replicase viral (polimerase de RNA dependente de RNA), denominada L, que possui massa de 240 a 260 kDa e é codificada pelo segmento genômico de mesmo nome (L). As proteínas estruturais dos vírions são a ribonucleoproteína N (26,5 kDa), codificada no segmento S, e as glicoproteínas G1 e G2 do envelope, codificadas no segmento M. Os RNAs genômicos estão associados com múltiplas cópias da proteína N e com algumas cópias da proteína L (RNA polimerase viral). As moléculas da proteína L interagem com as extremidades dos segmentos de RNA genômicos e com as moléculas da proteína N que recobrem o genoma, formando os nucleocapsídeos (Figura 29.1).



Fonte: A) Dra Linda Stannard; www.uct.ac.za

Figura 29.1. Vírions e genoma da família *Bunyaviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica de vírus do gênero *Phlebovirus* (vírus da febre do Vale Rift); B) Representação esquemática de uma partícula vírica e seus componentes; C) Estrutura do genoma. Segmentos L (grande); M (médio) e S (pequeno). No diagrama, está representada a organização genômica de um phlebovírus.

4 Replicação

As centenas de vírus da família *Bunyaviridae* apresentam várias propriedades biológicas em comum; porém, por constituírem uma população heterogênea, também apresentam muitas propriedades diferentes. Com exceção dos hantavírus, os vírus dos outros gêneros são capazes de replicar tanto em células de vertebrados (ou plantas, no caso dos tospovírus) como de artrópodes. Os efeitos da replicação nas células hospedeiras variam com o vírus e com o tipo de célula. Em geral, a replicação em células de mamíferos (e plantas) é citolítica; enquanto a replicação em células de artrópodes, geralmente, resulta em citopatologia discreta ou ausente.

4.1 O ciclo replicativo

A infecção se inicia pela ligação dos vírions com receptores na membrana celular por meio das glicoproteínas G1/G2. Nesse processo, a G1 parece desempenhar um papel mais importante em células de vertebrados; e a glicoproteína G2, nas células de artrópodes. Após a ligação, os vírions são internalizados por endocitose e se localizam no interior de vesículas endocíticas. A fusão e penetração dependem de pH ácido, que determina alterações conformacionais na G1 e/ou G2, fusão do envelope com a membrana endocítica e liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma. Durante a transcrição e replicação, os segmentos de RNA genômicos nunca são completamente desnudos, permanecendo associados com múltiplas cópias da proteína N.

A primeira etapa após o desnudamento parcial do genoma envolve a transcrição dos segmentos genômicos de RNA negativo, originando os RNA mensageiros (mRNA) que irão ser traduzidos em proteínas. Estes mRNA contêm 5' cap e parecem não ser poliadenilados. A tradução dos mRNAs dos segmentos L e S ocorre em ribossomos livres. As proteínas N e NSs dos *Phlebovirus*

estão presentes no citoplasma da célula infectada duas horas após a infecção. Algumas proteínas sofrem modificações após a tradução. A tradução dos mRNAs do segmento M é realizada em ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). A poliproteína codificada pelo segmento M (precursora das glicoproteínas) é clivada, originando a G1 e G2 que, a seguir, serão glicosiladas e modificadas no aparelho de Golgi.

Posteriormente, a transcrição completa do genoma irá resultar na produção de RNAs de sentido antígenômico, denominados cRNA (RNA complementar). Esses cRNAs não contêm cap e, portanto, não podem ser traduzidos. Os RNAs servem apenas de molde para a síntese de cópias de RNA genômico. Todos esses processos são realizados pelo complexo replicase (RNA polimerase viral + enzimas auxiliares). Etapas adicionais de transcrição e tradução ocorrem após a replicação do genoma, amplificando a quantidade de RNA e proteínas virais. Durante o processo de replicação, tanto as moléculas de cRNA como o RNA genômico permanecem associadas com múltiplas cópias da proteína N.

A morfogênese dos vírions ocorre em etapas: inicialmente os RNAs genômicos recém-sintetizados são conjugados com cópias múltiplas da proteína N, formando os nucleocapsídeos, aos quais se juntam algumas cópias da proteína L (polimerase). A próxima etapa envolve a interação dos nucleocapsídeos com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas, que estão localizadas nas membranas do aparelho de Golgi. Essa interação resulta no brotamento dos nucleocapsídeos para o lúmen do Golgi, processo pelo qual os vírions adquirem o envelope. Os vírions já formados são transportados no interior de vesículas do trans-Golgi até a membrana plasmática, onde são liberados para o meio extracelular por exocitose, sem a necessidade de lise celular. No ciclo replicativo de alguns bunivírus, os vírions podem realizar o brotamento diretamente na membrana plasmática. O ciclo replicativo dos bunivírus está ilustrado de forma esquemática na Figura 29.2.

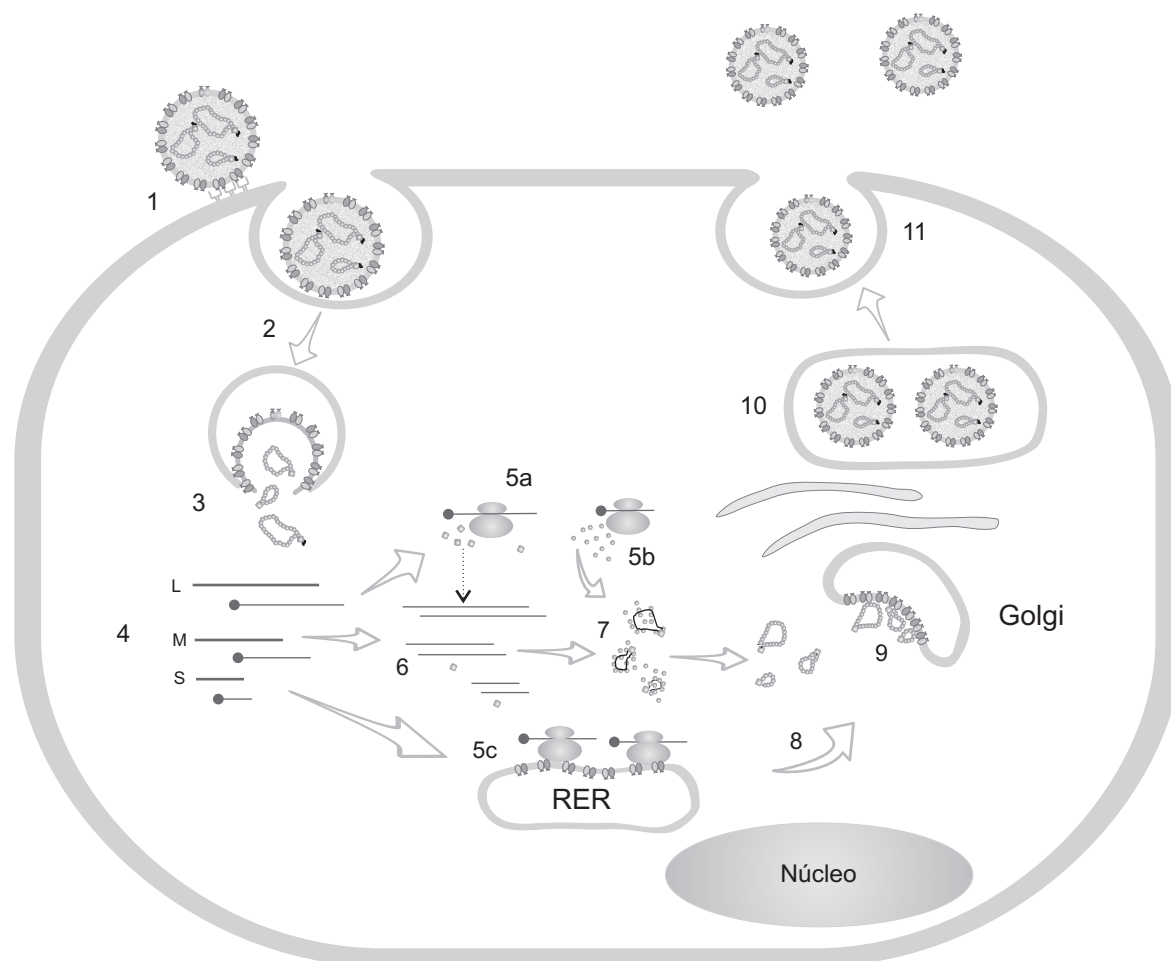


Figura 29.2. Ciclo replicativo dos bunivírus. 1) Ligação aos receptores celulares; 2) Internalização por endocitose, seguida de penetração por fusão do envelope com a membrana endocítica; 3) Desnudamento; 4) Transcrição dos segmentos de polaridade negativa e produção de mRNAs; 5a) Tradução dos mRNAs e produção de proteínas envolvidas na replicação do genoma e de proteínas estruturais (5b, 5c); 6) Replicação do genoma; 7) Formação dos nucleocapsídeos; 8) Transporte das glicoproteínas do envelope para o aparelho de Golgi; 9) Brotamento dos nucleocapsídeos para o interior do Golgi; 10) Transporte dos vírions em vesículas para a superfície celular; 11) Egresso por exocitose.

4.2 Expressão gênica e replicação do genoma

Os segmentos L de todos os gêneros e M (com exceção dos tospovírus) possuem sentido negativo, e a sua expressão e replicação segue os princípios gerais dos vírus RNA de polaridade negativa (Figura 29.3A). A polimerase viral transcreve o segmento de RNA genômico, produzindo um mRNA com cap que será traduzido em proteína. A extremidade 5' dos mRNAs é formada por segmentos de mRNAs com cap subtraídos de mRNAs celulares, a exemplo do que ocorre com os ortomixovírus. Em etapas subsequentes,

a polimerase/replicase altera o modo de síntese e produz uma cópia de cRNA que não possui cap. Essas moléculas servem de molde para a replicação, resultando na síntese de cópias de RNA com o sentido genômico (Figura 29.3A).

A estratégia de expressão do segmento S (*ambissense*) apresenta diferenças importantes em relação à expressão dos outros segmentos e do restante da família (Figura 29.3B). Nos phlebovírus, a ORF (*open reading frame*) do gene da nucleoproteína N está localizada na metade do segmento S, próxima à extremidade 3', e o gene da proteína NSs está localizado na outra metade. Esta proteína não-estrutural NSs (7,4 kDa) pos-

sua função pouco conhecida. A primeira etapa é a transcrição da primeira metade do gene, originando um mRNA que codifica a proteína N. Este mRNA será traduzido em proteína. A seguir, este segmento genômico é replicado em toda a sua extensão pela RNA polimerase, originando um RNA de sentido antígenômico (sentido positivo). Este RNA possui duas funções: a) serve de molde para a síntese de uma cópia de RNA de sentido genômico (replicação) e b) a metade próxima à extremidade 5' é transcrita, originando um RNA que corresponde ao gene da proteína NS. Por ser transcrito a partir de um RNA de sentido positivo (antígenômico), esse RNA possui o mesmo sentido do genoma (sentido negativo). No entanto, este RNA serve de mRNA e é traduzido na proteína NS, ou seja, o segmento S codifica uma

proteína (N) no sentido do mRNA de sentido positivo clássico; e a proteína NSs é codificada por um RNA com o sentido do genoma. Essa estratégia *ambissense* é observada no segmento S dos phlebovírus e tospovírus e no segmento M dos tospovírus. Neste último caso, os genes das proteínas G1 e G2 estão localizados na metade 3' do genoma e as proteínas são codificadas pela estratégia usual dos vírus RNA de sentido negativo (semelhante à proteína N do segmento S). O gene da proteína Nsm está localizado na região próxima à extremidade 5' do genoma e é expresso a partir de um RNA complementar, produzido pela transcrição da região correspondente do RNA antígenômico. Os arenavírus também utilizam a estratégia *ambissense* para expressar as suas proteínas.

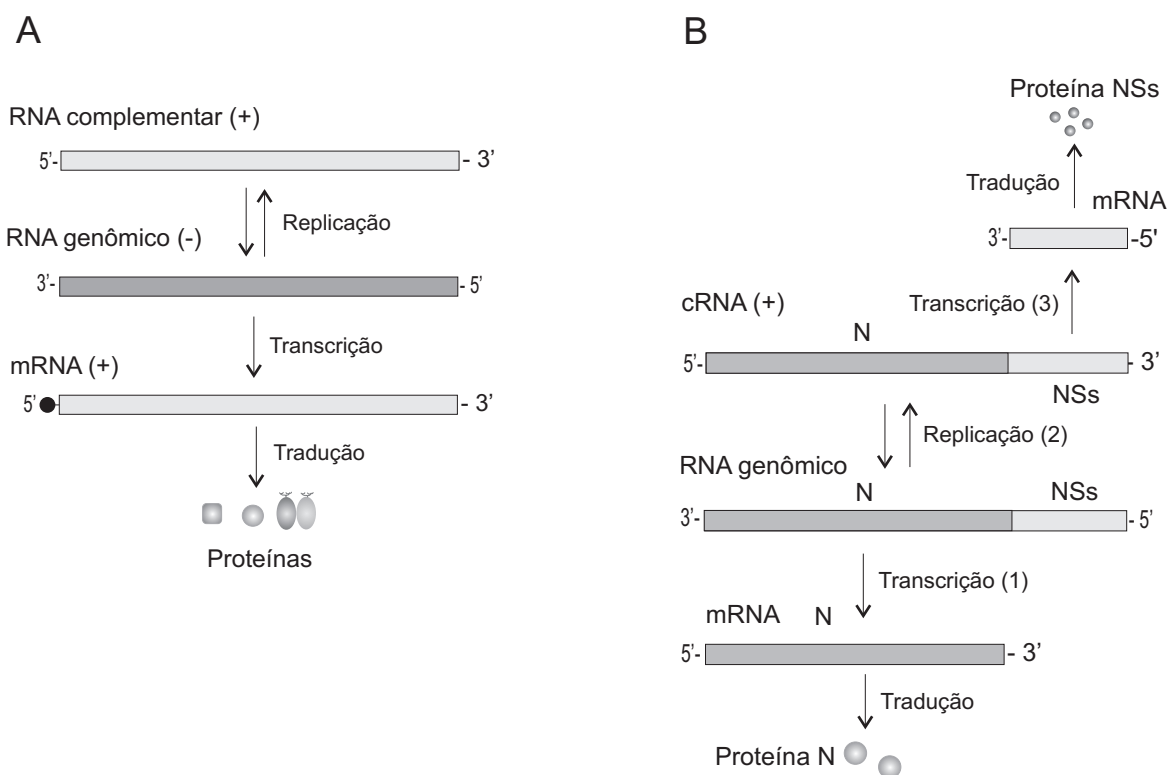


Figura 29.3. Estratégia de expressão gênica e replicação do genoma dos membros da família *Bunyaviridae*. A) Estratégia de expressão do segmento L nos membros dos quatro gêneros; e do segmento M para os membros dos gêneros *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*; B) Estratégia *ambissense* de expressão gênica, que ocorre no segmento M dos tospovírus e no segmento S dos tospovírus e phlebovírus. No diagrama, está representada a expressão do segmento S dos phlebovírus.

5 Biologia e patogenia

Os bunivírus utilizam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo diferentes espécies de mamíferos (e plantas no caso dos tospovírus) e gêneros de artrópodes. Uma vez que os bunivírus replicam em insetos, pode ocorrer a transmissão transovariana nesses vetores, o que permite a manutenção do agente durante estações frias.

A patogenia dos bunivírus é variada, uma vez que existem diferentes grupos de vírus dentro da mesma família, mas geralmente a inoculação do agente pela picada do inseto vetor determina uma viremia transiente, e a replicação e amplificação do vírus ocorre nos órgãos-alvo, que varia conforme os diferentes bunivírus. A patogenicidade e virulência também variam de acordo com o vírus. As infecções de vertebrados pelos bunivírus variam em severidade, incluindo desde infecções inaparentes até doenças severas e mesmo fatais.

6 Bunivírus de interesse veterinário

Embora vários membros da família *Bunyaviridae* sejam capazes de infectar e causar doença em hospedeiros vertebrados, a infecção de animais domésticos é, na maioria das vezes, acidental e não possui importância na manutenção desses vírus na natureza. Alguns bunivírus possuem importância apenas regional e não serão tratados neste texto. A seguir, serão apresentadas as doenças causadas por dois vírus que possuem alguma repercussão como patógenos animais: o vírus da febre do vale Rift (RVFV) e o vírus Akabane. O RVFV é um vírus zoonótico, o que não tem sido relatado para o Akabane até o presente. Ao final, será apresentado o hantavírus, um vírus zoonótico de roedores silvestres que tem sido associado com doença humana de grande importância em vários continentes.

6.1 Vírus da febre do vale Rift

A febre do vale Rift (RVF) é uma enfermidade que afeta primariamente ruminantes, mas também afeta humanos, podendo ser severa nessas espécies. A morbidade e mortalidade em

animais de produção podem levar a importantes perdas econômicas. O vírus (*Rift Valley fever virus*, RVFV) é transmitido para os mamíferos pela picada de insetos e, por isso, é considerado um arbovírus. A infecção nos ruminantes é caracterizada por altas taxas de abortos, alta mortalidade em neonatos e hepatite necrótica. Essa enfermidade é também conhecida como hepatite enzoótica de ovinos e caprinos.

O agente etiológico foi isolado inicialmente, em 1931, de uma ovelha infectada no vale Rift, do Quênia, daí a sua denominação. O RVFV pertence ao gênero *Phlebovirus*. Aparentemente, os isolados de campo não apresentam variações antigênicas marcantes, e a detecção de diferenças entre isolados pode exigir a análise genética. O vírus é sensível a desinfetantes, solventes lipídicos e a pH baixo. Sob pH neutro ou levemente alcalino, e na presença de proteínas (no soro, por exemplo), o vírus preserva a infectividade durante várias semanas. Em aerossóis, a vida média de infectividade é de, aproximadamente, 90 minutos a 25°C. Embora a principal forma de transmissão seja através de picadas de insetos, pessoas já foram infectadas por aerossóis produzidos durante o abate, pela manipulação de fetos abortados, durante necropsias e procedimentos laboratoriais.

6.1.1 Epidemiologia

O RVFV apresenta algumas peculiaridades epidemiológicas que favorecem a sua manutenção e disseminação na natureza. Esse vírus pode ser transmitido por diferentes gêneros de mosquitos e também por flebotomídeos, além de ser um vírus RNA e, como tal, é propenso a altas taxas de mutação. As mutações podem ter repercussão antigênica pequena (*drifts*) ou grande (*shifts*) e podem determinar um fenótipo de variabilidade antigênica e, assim, representar uma estratégia de evasão do sistema imune.

A febre do vale Rift (RVF) é uma zoonose viral de grande importância na África. Esta enfermidade permaneceu restrita ao sul do Saara até 1977, quando um grande surto ocorreu no Egito. Um dos fatores incriminados como responsável pela disseminação do agente foi a fonte de água abundante nos canais construídos para grandes

represas. Embora a doença estivesse restrita apenas ao continente africano, em 2000, o vírus se disseminou pela Península Arábica, produzindo dois surtos simultâneos na Arábia Saudita e no Iêmen.

Historicamente, os surtos de RVF ocorrem em diferentes regiões da África em intervalos de 5 a 15 anos. O longo intervalo de ocorrência desses eventos provavelmente deve-se à redução gradativa na susceptibilidade da população com o decorrer do tempo. Por muitos anos, o reservatório do vírus durante os períodos interepidêmicos foi desconhecido. Esse desconhecimento perdurou até que pesquisadores descobriram que ovos do mosquito *Aedes lineatopinnis*, presentes no solo dos dambos, continham o RVFV. Os dambos são depressões no solo que alternam períodos de plenitude hídrica em épocas de chuvas, com períodos de ausência de água em épocas de seca. Quando essas depressões se enchem de água, os ovos eclodem, e as larvas infectadas se tornam mosquitos que contêm e podem transmitir o vírus. Por isso, esses dambos são considerados os reservatórios de mosquitos (e do vírus).

Ao realizarem o repasto sangüíneo em ruminantes, os mosquitos inoculam o vírus, que é, posteriormente, amplificado no animal. Esse animal serve, então, de fonte de infecção para vetores de diferentes gêneros, que contribuem para uma rápida disseminação do agente. Se a área que possui os mosquitos infectados apresenta animais susceptíveis, é provável a ocorrência de casos clínicos. Por outro lado, em muitas regiões da África, a presença dos mosquitos e do vírus é enzoótica e, assim, casos clínicos dificilmente são observados. Nessas regiões, a circulação do vírus tem sido monitorada pelo uso de animais sentinelas.

Nos vetores, o vírus é transmitido pela via transovariana entre gerações. Uma característica peculiar é que o vírus pode permanecer “latente” nos ovos dos mosquitos durante estações secas (períodos interepizooticos). Quando os ovos infectados pela via transovariana eclodirem, darão origem aos mosquitos transmissores do RVFV.

Na África, os principais vetores do RVFV são os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*,

Culex, *Eretmapoites* e *Mansonia*. Na América do Norte, foi demonstrado que os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* são capazes de transmitir o RVFV experimentalmente. Também foi demonstrado que o *Culex pipiens*, um importante inseto existente no Egito e que se alimenta preferencialmente de animais febris, pode transmitir o vírus, o que aumenta a probabilidade de transmissão do agente.

Os casos clínicos são observados apenas quando existem condições propícias à presença dos vetores, aliado com a presença de hospedeiros susceptíveis. Os surtos da enfermidade no vale Rift, no Quênia, apresentam uma associação estreita com a variabilidade climática interanual observada nessa região.

A susceptibilidade à infecção está relacionada com a raça, idade e com o *status* imunitário do animal. Os ovinos e os bovinos são as espécies preferencialmente infectadas pelo RVFV e são considerados os grandes amplificadores dos vírus. A doença severa é mais freqüentemente observada em animais jovens, em ovelhas exóticas e em certas raças cruzadas de bovinos. Os cordeiros e os bezerros são altamente susceptíveis, e altas taxas de mortalidade são observadas nesses animais. Os humanos são altamente susceptíveis a infecção pelo RVFV, e o vírus é transmitido para pessoas por meio de insetos e de aerossóis. Embora os humanos não sejam a espécie hospedeira natural, a viremia produzida é suficiente para transmitir o vírus aos vetores. Assim, os humanos podem se constituir em potenciais disseminadores da infecção em áreas livres.

Surtos de RVF estão geralmente associados com chuvas, que favorecem a multiplicação dos insetos vetores. Chuvas localizadas são suficientes para criar condições necessárias ao desenvolvimento de um surto. A transmissão transovariana do vírus em mosquitos infectados e a amplificação do vírus em vertebrados asseguram a manutenção da epidemia.

Embora os ovinos e bovinos sejam as espécies de animais domésticos mais freqüentemente afetadas, o RVFV pode infectar uma variedade de espécies, com conseqüências clínico-patológicas variáveis (Tabela 29.1).

Tabela 29.1. Espectro e hospedeiros e consequências da infecção de diferentes espécies animais pelo RVFV.

Mortalidade ap. 100%	Doença severa abortos mortalidade	Doença severa, viremia, abortos	Infecção viremia	Refratários à infecção
Cordeiros	Ovelhas	Macacos	Eqüinos	Cobaíes
Bezerros	Bovinos	Camelos	Gatos	Coelhos
Cabritos	Cabras	Ratos	Cães	Suínos
Filhotes de cão	Búfalos	Esquilos	Macacos	Tartarugas
Filhotes de gato	Humanos			Sapos/rãs
Camundongos				Galinhas
Hamsters				Canários
Camundongos silvestres				Pombas
				Periquitos

6.1.2 Patogenia e sinais clínicos

A infecção pelo RVFV em animais não-prenhes é freqüentemente inaparente. Surtos de aborto e de mortalidade neonatal são freqüentemente observados quando o vírus infecta animais prenhes. Em animais idosos, pode-se observar hepatite, e a evolução da enfermidade freqüentemente resulta em morte. Em humanos, a infecção pode causar encefalite, cegueira, febre hemorrágica. A taxa de mortalidade pode chegar a 10%.

O período de incubação em animais recém-nascidos é de, aproximadamente, 12 horas. Em animais adultos, o período de incubação pode ser de mais de três dias. Em humanos, o período entre a infecção e o início dos sinais clínicos é de 4 a 6 dias.

Os sinais clínicos da infecção dependem da espécie infectada, assim como de condições fisiológicas, como a idade e gestação. Cordeiros podem apresentar hipertermia entre 40 e 42°C, acompanhada de anorexia. A taxa de mortalidade em cordeiros de até uma semana de idade pode ser superior a 90%. Em cordeiros com mais de uma semana, a taxa de mortalidade situa-se ao redor de 20%. Ovinos adultos desenvolvem febre (40-41°C) com descarga nasal mucopurulenta.

Em ovelhas prenhes, os sinais mais comumente observados são os abortos. A taxa de mortalidade entre as ovelhas que abortam pode chegar a 20-30%.

Os bezerros infectados pelo RVFV apresentam febre (40-41°C) e ficam apáticos. A taxa de mortalidade pode chegar a 70%. Os bovinos adultos desenvolvem febre, sialorréia, anorexia e fraqueza. Alguns animais podem apresentar diarreia fétida. Nessa faixa etária, a taxa de mortalidade raramente excede 10%. Em vacas prenhes, o sinal mais evidente da infecção também é o aborto.

Em humanos, os sintomas são semelhantes à gripe, com febre (37,8-40°C), cefaléia, dores musculares, fraqueza, náuseas e fotofobia. A maioria das pessoas se recupera em 4 a 7 dias. No entanto, em algumas pessoas são observadas complicações, como síndrome hemorrágica, icterícia e hematemese, melena e petéquias nas mucosas. Em 2 a 4 dias após a infecção, essas pessoas se tornam febris e geralmente morrem. Alguns indivíduos desenvolvem uma forma clínica de meningoencefalite. Outro sinal de complicação que pode ser observado é uma retinopatia, que pode ser detectada de 5 a 15 dias após o pico febril. Essas pessoas freqüentemente irão apresentar deficiências visuais.

6.1.3 Diagnóstico

Em áreas endêmicas ou de risco, deve-se suspeitar de RVF quando são observados os seguintes eventos: a) altas taxas de aborto em ovelhas e vacas (pode atingir 100%); b) altas taxas de mortalidade em cordeiros e em bezerros com menos de sete dias de idade; c) fetos abortados e neonatos com lesões no fígado; d) enfermidade semelhante à gripe em humanos, particularmente naqueles com contato com animais; e) ocorrência de enfermidade durante período de ocorrência dos vetores; e) disseminação rápida.

O diagnóstico da infecção é baseado na detecção de antígenos virais e na pesquisa de anticorpos em exames histopatológicos. Deve-se ter o máximo cuidado na manipulação das amostras, uma vez que o RVFV pode infectar humanos e casos de infecção humana adquirida durante necropsias e procedimentos laboratoriais já foram descritos. Amostras de vírus para o isolamento podem ser coletadas de fetos abortados ou de animais febris. As amostras a serem coletadas incluem o fígado, baço, sangue, cérebro e soro. Essas amostras podem ser submetidas ao isolamento viral, a RT-PCR por extenso ou, ainda, à imunoistoquímica. Para a confirmação sorológica da enfermidade, pode-se realizar a sorologia pareada, pelo uso do teste de soroneutralização (SN). Para pesquisa de anticorpos, a técnica de ELISA pode ser utilizada, tanto para detecção de IgM como de IgG.

6.1.4 Tratamento

Não existe tratamento para a RVF. No entanto, estudos em macacos e em outros animais têm demonstrado que a ribavirina é uma droga antiviral promissora para utilização futura em humanos. Outros estudos sugerem que o interferon, imunomoduladores e plasma sangüíneo de fase convalescente podem auxiliar no tratamento de pacientes com a RVF.

6.1.5 Controle e profilaxia

Em áreas enzoóticas, a vacinação é o único método de prevenir as perdas causadas pela in-

fecção. A movimentação de animais dessas áreas para áreas livres durante os períodos de atividade dos vetores deve ser restringida para prevenir epizootias. O controle dos vetores em áreas epizooticas seria uma medida lógica, mas possui pouca praticidade para áreas muito extensas. Durante as epizootias, todos os animais domésticos susceptíveis devem ser vacinados para prevenir a amplificação do vírus e a conseqüente reinfecção dos vetores.

As vacinas disponíveis comercialmente apresentam problemas de segurança e de eficácia. As vacinas atenuadas têm produzido abortos ou efeitos teratogênicos em fetos, além de não conferirem boa proteção adequada. Esses vírus vacinais são também patogênicos para humanos.

As vacinas inativadas são seguras, mas não conferem proteção adequada. Recentemente, um mutante atenuado, produzido por passagem em células Vero, está sendo testado para utilização em humanos. Esse vírus vacinal já foi testado em ovinos e bovinos, e não causou efeitos adversos em cordeiros recém-nascidos, em bezerros e em animais prenhes. Quando o vírus atenuado é inoculado em fetos de bovinos através de laparoscopia, esses fetos continuam o desenvolvimento normal e nascem soropositivos.

As vacinas atenuadas induzem a formação de anticorpos neutralizantes de maior magnitude e duração do que aqueles induzidos por vacinas inativadas. Tanto as pessoas como os animais imunizados com vacinas inativadas necessitam de revacinações anuais para a manutenção dos títulos de anticorpos. Títulos de anticorpos neutralizantes de magnitude superior a 20 são considerados protetores.

6.2 Vírus da doença de Akabane

A Akabane é uma doença vírica de ruminantes que determina importantes perdas econômicas em rebanhos reprodutores. As infecções, que são geralmente subclínicas em animais adultos, podem resultar em perdas reprodutivas graves quando ocorrem em fêmeas prenhes. Essas perdas incluem abortos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, além de malformações congênitas. O agente da doença Akabane é um ar-

bovírus pertencente ao grupo Simbu, do gênero *Orthobunyavirus* (vírus Akabane, AkV). Todos os isolados do AkV apresentam alguma reatividade sorológica cruzada, de forma que não existem diferentes sorotipos. Outros vírus relacionados com o vírus Akabane – Aino, Peaton, Tinaroo e Douglas – também estão associados com perdas reprodutivas. Nos EUA, uma síndrome similar em ruminantes é causada pelo vírus do vale Cachê, outro bunivírus, mas que não pertence ao grupo Simbu.

A doença de Akabane é comum nos trópicos e subtropicais entre as latitudes 35°N e 35°S. É endêmica no Norte da Austrália e surtos ocasionais ocorrem no Sul desse país quando existem condições para o vírus se disseminar. A enfermidade ocorre também no Japão, na Coreia, em Israel, no Zimbábue e em outros países da África. Evidências sorológicas da infecção têm sido encontradas em vários países da África, Ásia e em várias regiões da Austrália.

O vetor artrópode do AkV ainda não foi definitivamente identificado, mas evidências epidemiológicas indicam que o vírus seja disseminado por mosquitos. O vírus já foi isolado de várias espécies de mosquitos: *Aedes vexans*, *Culex* e *Culicoides oxystoma* no Japão; *Anopheles funestus* no Quênia; *Culicoides milnei* e *Culicoides imicola* na África; *Culicoides brevitarsis* e *Culicoides wadei* na Austrália. O principal vetor parece ser o *Culicoides brevitarsis*. O vírus Akabane não é transmitido por contato, nem por tecidos infectados, por exsudatos ou por fômites. Além disso, o vírus parece produzir uma infecção aguda em ruminantes, sem a geração do estado de portador.

O AkV é capaz de infectar naturalmente várias espécies de ruminantes, mas as perdas reprodutivas são observadas apenas em bovinos, ovinos e caprinos. Em ruminantes selvagens, embora existam relatos de sorologia positiva, alterações congênitas ainda não foram observadas. No entanto, acredita-se que, assim como em ruminantes domésticos, o vírus possa causar perdas reprodutivas nas espécies silvestres. Anticorpos contra o AkV já foram detectados em espécies domésticas não-ruminantes, como equinos e caninos. Até o presente, anticorpos antivírus Akabane não foram detectados em humanos.

A infecção de ruminantes adultos é geralmente subclínica. A viremia que se segue à infecção geralmente ocorre entre os dias um e seis e persiste por um a nove dias. Os sinais da infecção são observados apenas quando animais prenhes são infectados. Nestes, são observados sinais de doença reprodutiva, tais como: abortos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, malformações congênitas e distocias. O achado mais freqüente e que mais chama a atenção é o nascimento de animais com malformações. Os fetos infectados durante o primeiro trimestre de gestação geralmente são viçosos e alertas, mas não caminham. Embora alguns possam se desenvolver com assistência, são incoordenados, apresentam ataxia e podem apresentar paralisia em um ou mais membros. Atrofia muscular, exoftalmia, rotação de membro, produção excessiva de lágrima são alguns dos sinais que podem ser observados. Os fetos infectados no segundo terço gestacional normalmente apresentam artrogripose. As articulações são rígidas e não fazem flexão, e os músculos podem estar atrofiados. Torcicolo, escoliose e cifose também são freqüentemente observados. Alguns recém-nascidos podem apresentar anormalidades neurológicas além da artrogripose. Os animais nascidos muito fracos geralmente foram infectados tardiamente na gestação. Estes animais podem se manter de pé e caminhar, mas apresentam anormalidades comportamentais como: reflexo de sucção fraco ou ausente, depressão, torpor, hiperexcitabilidade periódica, surdez, nistagmo, incoordenação e cegueira. Deformidades no crânio são freqüentes. A maioria dos animais que nascem assim morrem ou são sacrificados pouco tempo após o nascimento. Em animais que nascem com sinais mais leves, estes se acentuam gradativamente e os animais geralmente morrem antes dos seis meses de idade.

As malformações congênitas ocorrem mais freqüentemente quando os fetos são infectados durante o primeiro terço gestacional. Em ovelhas, essas alterações ocorrem quando os fetos são infectados entre o 30° e 50° dia, dependendo da virulência da cepa. Em vacas, malformações congênitas são evidenciadas quando a infecção fetal ocorre entre os 62 e 92 dias de gestação. Em

cabras, quando a infecção fetal ocorre ao redor do 40º dia de gestação.

A maioria dos animais presentes em áreas endêmicas desenvolve uma resposta imune protetora contra o vírus. Os surtos de distúrbios reprodutivos normalmente ocorrem em áreas de instabilidade, quando existem condições favoráveis para a disseminação do vírus entre os animais susceptíveis. Fêmeas prenhes, quando introduzidas em áreas endêmicas, são muito susceptíveis. Após a infecção inicial, no entanto, adquirem imunidade e estão protegidas nas próximas gestações. Além disso, vacinas são disponíveis em alguns países, reduzindo o risco de infecção em fêmeas gestantes introduzidas em áreas endêmicas.

O diagnóstico da infecção é comumente realizado por testes sorológicos. Anticorpos podem ser detectados no soro do feto ou dos bezerras antes da ingestão do colostro. Outros fluidos corporais, como o liquor, também podem ser utilizados para a pesquisa de anticorpos. Deve-se salientar que a ausência de anticorpos no soro fetal ou de recém-nascidos não descarta a infecção pelo vírus Akabane. Em adultos, a sorologia é importante em áreas onde o vírus não é endêmico. A ausência de anticorpos na mãe descarta a infecção no feto ou no neonato. Entre os testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da infecção, destacam-se: a SN, a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e a inibição da hemaglutinação (HI).

O isolamento do vírus Akabane pode ser realizado pela inoculação de macerados de tecidos em camundongos lactentes, em embriões de galinha com quatro dias ou em uma variedade de cultivos celulares. O vírus é identificado, posteriormente, através de imunofluorescência (IFA) ou por neutralização com anti-soro específico. No entanto, o vírus é dificilmente isolado da placenta e dos tecidos dos fetos abortados. A chance de isolamento aumenta quanto menor for a imunidade do feto abortado. A partir de tecidos maternos, o isolamento do vírus Akabane é mais difícil, porque as consequências da replicação viral só são evidenciadas um longo período após a infecção.

A Akabane é uma enfermidade de notificação obrigatória. Uma vez detectada a infecção em uma propriedade, esta entra em quarentena para desinfecção. Como o vírus Akabane não parece ser transmitido diretamente entre os animais, o controle é baseado no combate a vetores que possuam potencial para atuarem como transmissores do vírus. As medidas recomendadas incluem o uso de pesticidas e procedimentos para minimizar o contato de insetos com os animais. Se a desinfecção for necessária, utilizam-se desinfetantes – como o hipoclorito – detergentes, compostos à base de cloro, álcool, fenol e desinfetantes comerciais. Para prevenir a infecção de fêmeas prenhes, as fêmeas do rebanho devem ser vacinadas anualmente antes da estação de monta.

Diferentes vacinas são disponíveis nos países que apresentam a infecção. No Japão, uma vacina inativada e outra atenuada estão disponíveis comercialmente. Na Austrália, está sendo desenvolvida uma vacina inativada com resultados promissores. No entanto, ainda não está disponível comercialmente. A vacinação deve ser utilizada anteriormente ao potencial contato com os vetores infectados, com o intuito de aumentar o nível de anticorpos circulantes e, com isso, prevenir a infecção fetal.

6.3 Hantavírus

A hantavirose é uma enfermidade infecciosa grave que afeta humanos, cujo agente possui roedores silvestres e domésticos como hospedeiros naturais e reservatórios. A enfermidade apresenta duas formas clínicas: a febre hemorrágica com síndrome renal (HFRS) e a síndrome pulmonar por hantavírus (HPS), também conhecida como síndrome cardiopulmonar por hantavírus (CPSH). A HFRS foi descrita na década de 1950, na Coreia e Rússia, e foi chamada inicialmente de febre hemorrágica da Coreia. Os sinais clínicos eram inicialmente semelhantes aos da gripe, seguidos de hipotensão, trombocitopenia e falência renal. Em 1993, na região de *Four Corners* (Novo México, Arizona, Colorado e Utah), nos Estados Unidos, foi descrita uma enfermidade com sinais semelhantes aos da gripe e com comprometimen-

to respiratório grave, com mortalidade de até 50%, denominada HPS. O vírus envolvido com a nova enfermidade foi classificado no gênero *Hantavirus* e denominado *Sin nombre*.

O agente etiológico da enfermidade é um vírus do gênero *Hantavirus*. O gênero possui grande diversidade genética, razão pela qual isolados com características diferentes têm sido responsabilizados pelos surtos ocorridos em todo o mundo. Os principais causadores da HFRS são os vírus *Hantaan*, *Seoul*, *Puumala* e *Dobrava*.

No Brasil, a HPS foi diagnosticada, pela primeira vez, em 1993, no município de Juquitiba, estado de São Paulo. A enfermidade é de notificação compulsória, e até 2005 já haviam sido notificados 664 casos de hantavirose em humanos, com 270 mortes, a maior parte dos casos ocorridos na região Sul do país. Até o momento não existem relatos da HFRS no Brasil. Na Europa e Ásia, os roedores das subfamílias *Murinae* e *Arvicolinae* são os principais transmissores das hantavirose, principalmente os gêneros *Apodemus* e *Clethrionomys*. Nas Américas, os transmissores pertencem à subfamília *Sigmodontinae*. No Brasil, os roedores da espécie *Bolomys lasiurus* são responsáveis pela transmissão nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, enquanto os roedores da espécie *Oligoryzomys nigripes* são os responsáveis nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Os roedores eliminam o vírus pela urina, fezes e saliva. A transmissão para humanos ocorre principalmente pela inalação de partículas desidratadas das fezes dos roedores contaminados. A mordedura dos roedores infectados também pode transmitir o vírus para humanos. A transmissão entre humanos não é frequente, embora já tenha sido relatada em um surto da HPS causado pelo vírus *Andes*, na Argentina, em 1996. Entre os roedores, a infecção é caracterizada pela ausência de sinais clínicos, e os animais estabelecem uma infecção persistente que se mantém por meses ou anos. Entre os roedores, o vírus é transmitido de forma horizontal, principalmente por arranhões e mordidas e também pela inalação de aerossóis com partículas virais. Estudos de prevalência em roedores demonstram que os machos são os prin-

cipais portadores e disseminadores da enfermidade. Apesar da ausência de sinais clínicos, infecções experimentais em roedores indicam que a viremia pós-infecção pode durar duas semanas, quando há disseminação do vírus pelos tecidos do hospedeiro.

A patogenia tanto da HPS quanto da HFRS é caracterizada por uma resposta imune exacerbada, que leva à liberação de citocinas envolvidas no aumento de permeabilidade vascular. Os vírus possuem capacidade de se ligar em plaquetas por receptores, levando essas plaquetas a serem retiradas da circulação, provocando a trombocitopenia observada nas duas apresentações clínicas da hantavirose. Na HPS, ocorre ainda destruição de antígenos nas células endoteliais do coração e tecidos linfóides. Os pulmões apresentam infiltrados de linfócitos T/CD8, que produzem citocinas, estimulando os macrófagos a produzir TNF, IL-1, IFN gama, que aumentam a permeabilidade vascular, levando à formação de edema pulmonar.

Após a inalação do agente, os sinais se iniciam entre 15 e 20 dias. Os sintomas da forma cardiopulmonar são febre, mialgias, cefaléia, além de tosse seca e edema pulmonar. A HFRS apresenta sinais de trombocitopenia, diátese hemorrágica e insuficiência renal.

O diagnóstico laboratorial é realizado pela detecção de anticorpos específicos, principalmente pela técnica de ELISA, para detecção de IgM, e por imunofluorescência indireta (IFA). O isolamento viral não é muito utilizado em razão da dificuldade de propagação do vírus em cultivo celular.

O tratamento para hantavirose é de suporte, e a letalidade depende do vírus envolvido, do tempo de início do tratamento e de fatores individuais, como idade e imunidade do paciente. Algumas vacinas inativadas contra a HFRS são utilizadas para os vírus *Seoul* e *Hantaan*, na Ásia, e, aparentemente, não promovem proteção contra os hantavírus. Estudos são realizados para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra a forma cardiopulmonar e para a produção de vacinas de DNA. O controle da enfermidade deve ser realizado principalmente com medidas de saneamento básico, controle de roedores e prevenção de contato com esses animais.

6.4 Vírus da doença das ovelhas de Nairobi

A doença das ovelhas de Nairobi (*Nairobi sheep disease*, NSD) é uma doença viral não-contagiosa de ovinos e caprinos, caracterizada por gastroenterite hemorrágica e alta mortalidade. O agente, um vírus classificado no gênero *Nairovirus*, da família *Bunyaviridae*, é transmitido primariamente por carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus*. O vírus causador da NSD (NSDV) é antigenicamente distinto dos outros membros da *Bunyaviridae*, sendo mais relacionado com o vírus Ganjam, que afeta caprinos na Índia, e com o vírus Dugbe, isolado de bovinos no Oeste da África. Os vírus desses três grupos compõem o gênero *Nairovirus*. A infecção pelo NSDV é restrita primariamente ao Leste da África (Kênia, Uganda, Tanzânia, Somália), onde se encontram os habitats do carrapato vetor. No entanto, sorologia positiva para vírus antigenicamente relacionados, além de casos clínicos semelhantes, também foram relatados em ovinos no Congo e Etiópia.

Dentre as espécies domésticas, o NSDV infecta naturalmente apenas ovinos e caprinos, e tentativas de reproduzir a infecção em animais de produção e de laboratório falharam. Acredita-se que uma espécie de rato africano, o *Arvicatus abyssinicus nubilans*, seja o hospedeiro natural do agente. Existem algumas evidências de infecção em humanos com sinais clínicos semelhantes à gripe, embora o seu caráter zoonótico não tenha sido bem documentado. De qualquer maneira, profissionais e pessoas envolvidas com o manejo e cuidados de animais doentes devem adotar medidas de biossegurança para evitar a exposição a aerossóis e outros materiais contaminados.

Na natureza, o vírus é transmitido principalmente por carrapatos do gênero *Rhipicephalus appendiculatus*, embora outros carrapatos também possam transmiti-lo. Nos carrapatos, o vírus é transmitido de forma transestadial, e os adultos podem abrigar o vírus por mais de dois anos. Após a inoculação de vertebrados durante o repasto sangüíneo, a infecção apresenta um período de incubação de 4 a 15 dias. Em ovinos e caprinos inoculados experimentalmente, o período de incubação é inferior, entre 1 e 3 dias.

A enfermidade é caracterizada por gastroenterite hemorrágica aguda, que inicia com febre alta e se segue com depressão, declínio da temperatura corporal e diarreia. Corrimento nasal mucopurulento e dificuldade respiratória são freqüentemente observados. As fezes são inicialmente liquefeitas, mas passam a conter muco e sangue com a evolução da doença. Casos subagudos, em que os animais apresentam fraqueza e quadros recorrentes de diarreia; e casos supragudos, em que os animais apresentam apenas febre alta seguida de colapso e morte súbita, também têm sido relatados. Abortos também podem ocorrer associados com os surtos.

Os achados patológicos incluem hiperemia e petéquias da mucosa do abomaso, enterite hemorrágica no ceco e porção anterior do cólon. A mucosa do intestino grosso pode estar recoberta com petéquias e com conteúdo sanguinolento. Hiperplasia generalizada nos órgãos linfóides também é um achado comum. Fêmeas prenhes podem apresentar hiperemia no trato genital, edema e hemorragias nas membranas fetais. Fetos abortados apresentam petéquias e sufusões em vários órgãos.

Em áreas endêmicas, a maioria da população de ovinos e caprinos é imune ao vírus, e a enfermidade acomete principalmente animais introduzidos a partir de áreas livres. De fato, os surtos estão quase sempre associados com movimento de animais susceptíveis para áreas de ocorrência dos carrapatos vetores. Épocas de chuvas também favorecem a ocorrência da doença, pela maior população dos vetores.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pelo isolamento do vírus a partir de plasma ou sangue com anticoagulante, coletado durante a fase aguda da doença. O vírus pode ser identificado por imunofluorescência (IFA) realizada em cultivos celulares previamente inoculados com o material suspeito. O vírus replica bem em cultivos celulares de origem ovina, caprina e também de *hamster*. A inoculação intracerebral de camundongos lactentes é um método alternativo de diagnóstico, e o vírus pode ser identificado por IFA ou fixação de complemento.

O diagnóstico diferencial deve considerar doenças como a febre do vale Rift, antrax e algu-

mas intoxicações, peste dos pequenos ruminantes e coccidiose.

Animais que se recuperam da infecção desenvolvem imunidade sólida, que dura, provavelmente, por toda a vida. Cordeiros e cabritos recém-nascidos parecem adquirir imunidade das mães pelo colostro, o que os protege durante as primeiras semanas de vida. Vacinas atenuadas, obtidas pela passagem do vírus em cultivos celulares ou por passagens em cérebros de camundongos têm sido utilizadas, mas o seu uso tem sido matéria de debate. A maior restrição ao seu uso extensivo deve-se à variabilidade de resposta ao vírus vacinal entre raças diferentes de animais.

O controle da enfermidade baseia-se no combate aos carrapatos, pelo uso de carrapaticidas, e nos cuidados com animais susceptíveis introduzidos em áreas endêmicas. Nestes animais, pode-se proceder a vacinação para evitar a ocorrência da doença. Os animais de áreas endêmicas geralmente possuem imunidade conferida pela infecção natural e são pouco susceptíveis à enfermidade.

6.5 Febre hemorrágica da Criméia-Congo

A febre hemorrágica da Criméia-Congo (CCHF) é uma enfermidade zoonótica causada por um vírus do gênero *Nairovirus* e transmitida por carrapatos. A enfermidade foi identificada inicialmente na Criméia, em 1944, e, posteriormente, no Congo, em 1956, derivando daí a sua denominação. A doença é endêmica em vários países da África e Ásia e tem sido descrita também em vários países da Europa Oriental e Oriente Médio. Evidências sorológicas limitadas têm indicado a sua presença também em Portugal, França, Turquia, Egito e Índia. Em humanos, a infecção se caracteriza por febre, sinais semelhantes à gripe, prurido, freqüentemente seguidos de eventos hemorrágicos e hepatite necrosante. Embora classicamente considerada uma zoonose, casos de CCHF em pessoas têm sido muito mais esporádicos do que a sua ocorrência em animais. Na natureza, o vírus infecta várias espécies de animais e causa febre e viremia em bovinos,

ovinos e pequenos mamíferos, como lebres e coelhos silvestres. Sorologia positiva para o vírus tem sido detectada em várias espécies animais de mamíferos silvestres e cativos do Sudeste e Sul da África, indicando a sua ampla distribuição. Dentre as espécies soropositivas, incluem-se bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, cães, mamíferos silvestres (74 espécies), além de algumas espécies de aves. Acredita-se que, na maioria, senão em todas essas espécies, a infecção cause apenas febre transitória e, muitas vezes, pode ser absolutamente subclínica.

A doença é causada por um vírus pertencente ao gênero *Nairovirus*, classificado em um dos seis sorogrupos que formam o gênero. Vírus relacionados já foram identificados no Oriente Médio, Ásia e antiga União Soviética. O vírus replica em uma variedade de células primárias e de linhagem, incluindo Vero, BHK-21 e CER, nas quais produz citopatologia discreta e de difícil percepção. O isolamento e titulação do vírus geralmente são realizados pela inoculação intracerebral de camundongos lactentes. O caráter zoonótico e a possibilidade de transmissão por contato coloca o agente no nível de biossegurança 4 (BSL-4) dentre os agentes patogênicos manipuláveis em laboratório.

A exemplo de outros vírus do gênero, o agente da CCHF é transmitido entre animais por carrapatos pertencentes a vários gêneros. O vírus já foi isolado de aproximadamente 30 espécies de carrapatos. No entanto, os carrapatos do gênero *Hyalomma* parecem ser os principais envolvidos na transmissão e manutenção do vírus em áreas endêmicas, podendo ser transmitido de forma transestadial nesses invertebrados. A distribuição geográfica da enfermidade segue fundamentalmente a distribuição desses vetores. O vírus persiste nos vetores em todos os estádios de seu desenvolvimento e é transmitido aos animais através da inoculação de saliva contaminada. Mamíferos infectados geralmente desenvolvem altos títulos de viremia durante aproximadamente uma semana, período no qual o vírus pode ser transmitido. Pessoas podem ser infectadas por contato direto com sangue, tecidos ou secreções desses animais ou, eventualmente, através da picada de carrapatos. A maioria dos casos hu-

manos relatados foi ocupacional, ou seja, afetou indivíduos envolvidos com atividades ligadas a pecuária ou a matadouros. A reduzida incidência da doença humana, mesmo em áreas endêmicas e em indivíduos com alto risco de exposição, sugere que a maioria das infecções é assintomática.

Em pessoas, o período de incubação varia de acordo com a forma de transmissão. Em indivíduos infectados pela picada de carrapatos, este período varia entre um e três dias; após contato com sangue ou tecidos contaminados, o período varia entre cinco e seis dias, atingindo um máximo de 13 dias. Os sinais iniciais são típicos de viroses como a gripe, com cefaléia, mialgia, febre, dor nos olhos, fotofobia. Náuseas, vômitos e faringite são observados com frequência. Alterações de comportamento, como agressividade e confusão mental, também têm sido relatados. Após dois ou três dias, esses sinais podem ser substituídos por depressão, sonolência e dor abdominal, causada por hepatomegalia. Casos agudos graves podem incluir eventos hemorrágicos, como petéquias e sufusões em mucosas, melena, hematúria, epistaxe e sangramento das gengivas. Nestes casos, geralmente ocorre envolvimento hepático e renal, acompanhado de insuficiência respiratória após o quinto ou sexto dia da doença. A mortalidade atinge 30% dos infectados e ocorre geralmente durante a segunda semana da doença; indivíduos que conseguem debelar a infecção se recuperam a partir do nono ou décimo dia.

Para o diagnóstico, a enfermidade deve ser considerada em áreas endêmicas sempre que ocorrerem sinais semelhante à gripe, com aparecimento súbito e curta duração, em pessoas potencialmente expostas a material animal contaminado ou a carrapatos. O prurido, que frequentemente ocorre, direciona o diagnóstico, assim como as petéquias e hematemese. O diagnóstico laboratorial é realizado pelo isolamento e identificação do vírus após inoculação de plasma ou sangue em células de cultivo e detecção de antígenos virais por IFA.

O controle deve se basear no combate aos carrapatos e na prevenção da exposição humana a animais, sangue e tecidos potencialmente contaminados. Indivíduos constantemente em contato com animais e subprodutos devem utilizar pro-

teção pessoal para minimizar o risco de contágio. Vacinas inativadas de uso humano, obtidas pela passagem do vírus em cérebro de camundongos, já foram utilizadas em áreas endêmicas na antiga União Soviética, mas não se encontram disponíveis para uso em larga escala.

7 Bibliografia consultada

CHARLES, J.A. Akabane virus. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.10, p.525-546, 1994.

DIXON, K.E. et al. Oropouche virus: Epidemiological observations during an epidemic in Santarém, Pará, Brazil in 1975. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, p.161-164, 1981.

DROSTEN, C. et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2323-2330, 2002.

GEORGE, T.D.S.; STANDFAST, H.A. Diseases caused by Akabane and related Simbu-group viruses. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (eds.) **Infectious diseases of livestock**. Cape Town, South Africa: Oxford, 1994. Cap.70, p.681-687.

GONZALEZ-SCARANO, F.; NATHANSON, N. Bunyaviridae. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.) **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.48, p.1473-1504.

HARTLEY, W.J. et al. Serological evidence for the association of Akabane virus with epizootic bovine congenital arthrogryposis and hydranencephaly syndromes in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.103-104, 1975.

HIJELLE, B.; GLASS, G.E. Outbreak of hantavirus infection in the Four Corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Niño-southern oscillation. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.1569-1573, 2000.

HUI, E.K. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. **Microbes and Infection**, v.8, p.905-916, 2006.

HUNT, A.R.; CALISHER, C.H. Relationships of Bunyamwera group viruses by neutralization. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.28, p.740-749, 1979.

ICTVdb. **Bunyaviridae**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>. Acesso em: 15 jan. 2007.

KIRKLAND, P.D. et al. The development of Akabane virus-induced congenital abnormalities in cattle. **The Veterinary Record**, v.122, p.582-586, 1988.

- KONNO, S.; MORIWAKI, M.; NAKAGAWA, M. Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. Spontaneous disease. **Veterinary Pathology**, v.19, p.246-266, 1982.
- LEE, J.K. et al. Encephalomyelitis associated with akabane virus infection in adult cows. **Veterinary Pathology**, v.39, p.269-273, 2002.
- MERTZ, G.J. Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. In: RICHMAN, D.D.; WHITLEY, R.J.; HAYDEN, F.G. (eds). **Clinical virology**. New York: Churchill-Livingstone, 1997. p.943-972.
- PETERS, C.J. et al. Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers: Rift Valley fever and Lassa fever contrasted. **Reviews of Infectious Diseases**, v.11, p.S473-479, 1989.
- PETERS, C.J. HPS in the Americas. In: SCHELD, W.M.; CRAIG, W.A.; HUGHES, J.M. (eds). **Emerging Infectious Diseases 2**. Washington, DC: ASM Press, 1998. p.17-64.
- SCHMALJOHN, C.S. Bunyaviridae: The Viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.47, p.1447-1471.
- SCHMALJOHN, C.S. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fundamental virology**. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. p.649-673.
- SCHMALJOHN, C.S.; HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.95-104, 1997.
- SWANEPOEL, R.; COETZER, J.A.W. Rift Valley fever. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (eds.) **Infectious diseases of livestock**. Cape Town, South Africa: Oxford, 1994. Cap.71, p.688-717.
- SWANEPOEL, R. Crimean-Congo haemorrhagic fever. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (eds.) **Infectious diseases of livestock**. Cape Town, South Africa: Oxford, 1994. Cap.73, p.724-729.
- TERPSTRA, C. Nairobi sheep disease. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (eds.) **Infectious diseases of livestock**. Cape Town, South Africa: Oxford, 1994. Cap.72, p.718-721.
- VASCONCELOS, P.F.C. et al. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos Estados do Maranhão e Goiás, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31, p.271-278, 1989.
- WELLS, R.M.; ESTANI, S.S.; YADON, Z.E. An unusual outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.171-174, 1997.
- WILSON, M.L. Rift Valley fever virus ecology and the epidemiology of disease emergence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.740, p.169-180, 1994.

1 Introdução	775
2 Classificação	775
3 Gênero <i>Orthoreovirus</i>	777
3.1 Características do vírion e do genoma	777
3.2 Propriedades gerais	778
3.3 <i>Orthoreovirus</i> de mamíferos	779
3.4 <i>Orthoreovirus</i> aviários	779
4 Gênero <i>Rotavirus</i>	780
4.1 Classificação	781
4.2 Propriedades dos vírions, estrutura e organização genômica	782
4.3 Replicação	786
4.4 Doenças causadas por rotavírus	788
4.4.1 Patogenicidade e sinais clínicos	790
4.4.2 Imunidade	790
4.4.3 Diagnóstico	791
4.4.4 Controle e profilaxia	792
5 Gênero <i>Orbivirus</i>	793
5.1 Propriedades gerais	793
5.2 O vírion, o genoma e as proteínas virais	794
5.3 Replicação	796
5.4 Patogenicidade	797
5.5 Vírus da língua azul	798
5.5.1 Epidemiologia	798
5.5.2 Patogenicidade, sinais clínicos e patologia	800
5.5.3 Diagnóstico	802
5.5.4 Controle e profilaxia	802
5.6 Vírus da doença hemorrágica epizootica dos cervídeos	803
5.6.1 Epidemiologia	803

5.6.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia	804
5.6.3 Diagnóstico	804
5.6.4 Controle e profilaxia	805
6 Bibliografia consultada	805

1 Introdução

A família *Reoviridae* é composta por vírus que infectam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo invertebrados, plantas e vertebrados. As infecções de vertebrados afetam principalmente os tratos gastrointestinal e respiratório. A denominação *Reovirus* é derivada das palavras *Respiratory*, *Enteric* e *Orphan*, sendo esta última denominação (órfãos) referente a vírus que não puderam ser associados com nenhuma doença conhecida. Embora vários desses vírus já tenham sido relacionados recentemente com algumas doenças, o nome ainda persiste.

Os vírus que compõem essa família compartilham as seguintes características: a) vírions com simetria icosaédrica; b) ausência de envelope glicoprotéico; c) genoma constituído por RNA fita dupla (dsRNA) segmentado; d) RNA genômico infeccioso somente quando associado com as proteínas virais; e) transcriptase presente nos vírions; e f) replicação no citoplasma da célula hospedeira.

O tipo e organização do genoma são as principais características em comum dos vírus incluídos na família *Reoviridae*. O genoma desses vírus é constituído por 10, 11 ou 12 moléculas de dsRNA, ou seja, possuem o genoma segmentado. Em geral, cada segmento genômico codifica uma proteína viral, mas há casos em que duas ou até três proteínas são codificadas pelo mesmo segmento. Vírus com o genoma constituído por dsRNA também podem ser encontrados em outras cinco famílias virais. No entanto, somente duas (*Reoviridae* e *Birnaviridae*) possuem vírus que infectam vertebrados. Destas, apenas os vírus da família *Reoviridae* produzem infecções em mamíferos. Os vírions dos membros da *Reoviridae* possuem uma arquitetura complexa: são desprovidos de envelope, possuem 60 a 85 nm de diâmetro, simetria icosaédrica e capsídeo duplo. A exemplo da maioria dos vírus RNA, esses vírus realizam o seu ciclo replicativo no citoplasma da célula hospedeira.

A família *Reoviridae* é bastante complexa com relação às suas características biológicas e moleculares. A família é composta por 11 gêneros, porém apenas cinco estão associados com doen-

ça em vertebrados. Destes, apenas os orbivírus e rotavírus possuem importância em medicina veterinária. Não obstante, os vírus do gênero *Orthoreovirus* também possuem alguma importância veterinária e serão abordados resumidamente.

Embora compartilhem várias propriedades estruturais, genéticas e biológicas, os diferentes gêneros que compõem a família *Reoviridae* também apresentam diferenças importantes entre si. Por essa razão, os gêneros *Orthoreovirus*, *Rotavirus* e *Orbivirus* serão abordados separadamente.

2 Classificação

A família *Reoviridae* é composta por 11 gêneros, dos quais apenas cinco infectam vertebrados (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus* e *Aquareovirus*). Destes, apenas os gêneros *Orbivirus* e *Rotavirus* ocasionam infecções que, por suas características epidemiológicas e pela gravidade dos sinais clínicos, são consideradas importantes em mamíferos. Alguns ortoreovírus também produzem infecções de alguma importância clínica em humanos e animais (Tabela 30.1). Fotografias de microscopia eletrônica de vírions representativos dos ortoreovírus, rotavírus e orbivírus estão apresentados na Figura 30.1.

O gênero *Aquareovirus* contém diversos vírus que já foram isolados de várias espécies de peixes de água doce e salgada, ostras e outros moluscos. Com base em técnicas de hibridização (RNA-RNA), são descritas seis espécies de aquareovírus, denominadas de A a F. Esses vírus apresentam uma grande especificidade de hospedeiro, de acordo com a espécie viral. Tanto o potencial patogênico quanto o impacto econômico da maioria das infecções ocasionadas pelos aquareovírus ainda não estão claramente definidos.

O vírus da febre do carrapato do Colorado (*Colorado tick fever virus*, CTFV) é o protótipo do gênero *Coltivirus*. O CTFV tem sido isolado de carrapatos, roedores e de seres humanos na América do Norte. Um outro vírus, denominado Eyach, também isolado de carrapatos e, possivelmente, de seres humanos na Europa (Alemanha e França), apresenta reação cruzada em testes

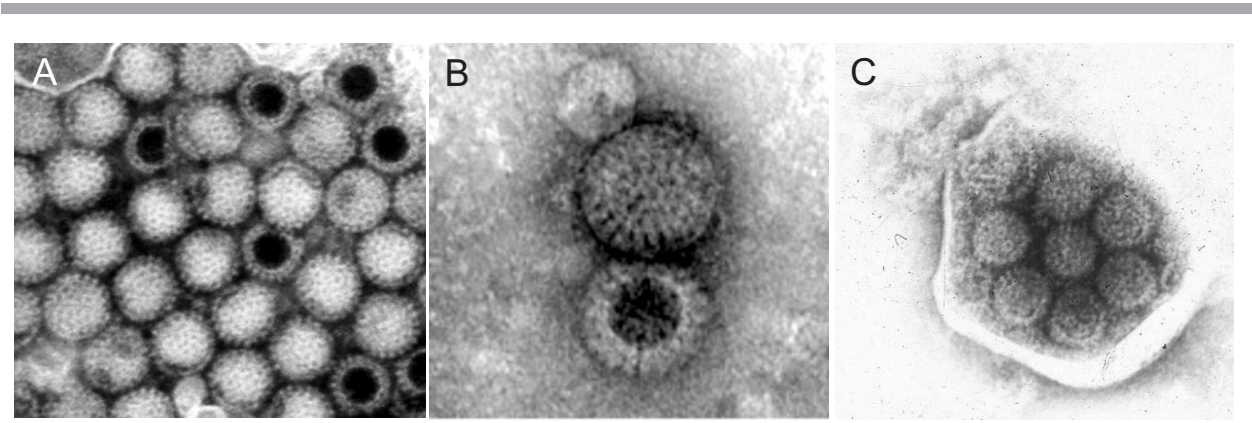
de neutralização com o CTFV. Esses dois vírus, que são facilmente distinguíveis, foram relatados como sorotipos distintos e incluídos no subgrupo A dos coltívirus.

Mais recentemente, verificou-se que vários isolados de coltívirus, provenientes da Indonésia e da China, eram sorologicamente distintos dos coltívirus do subgrupo A. Em 2001, foi propos-

Tabela 30.1. Principais vírus da família *Reoviridae* associados com doenças em animais.

Gênero	Vírus	Espécies afetadas	Doença
<i>Orthoreovirus</i>	Reovírus de mamíferos 1-3	Isolado de vários mamíferos	Hepatoencefalomielite em camundongos
	Reovírus aviários 1-11	Galinhas, perus e gansos	Artrite, nefrose, enterite, doença respiratória crônica, miocardite
<i>Rotavirus</i>	Rotavírus: vários, geralmente espécie-específicos	Virtualmente todas as espécies	Enterite
<i>Orbivirus</i>	Vírus da língua azul 1-25	Ovinos, bovinos e cervídeos	Língua azul
	Vírus da peste eqüina 1-9	Eqüinos, asnos, burros e zebras	Peste eqüina
	Vírus da encefalose eqüina 1-5	Eqüinos	Aborto e encefalite
	Vírus da doença epizootica hemorrágica dos cervos 1-7	Cervos	Doença epizootica hemorrágica
	Vírus Ibaraki	Bovinos	Doença febril aguda, similar a língua azul
	Vírus Palyam 1-6	Bovinos	Aborto, malformações congênicas

Fonte: adaptado de Murphy et al. (1999).



Fonte: A) Dr. Stewart McNulty; qub.ac.uk; B) Dr C. Büchen-Osmond, ICTVdB; C) www.usask.ca

Figura 30.1. Fotografias de microscopia eletrônica de vírions representativos dos gêneros *Orthoreovirus* (A), *Rotavirus* (B), e *Orbivirus* (C).

to que fosse criado um novo gênero na família *Reoviridae* para esses isolados asiáticos: *Seadornavirus*. Então, somente os vírus com características antigênicas do subgrupo A permaneceram no gênero *Coltivirus*. Nesse novo gênero, ainda não foram descritos isolamentos em animais.

A febre do carrapato do Colorado é uma zoonose que ocorre em uma região geográfica bem definida na América do Norte (Montanhas Rochosas, estado do Colorado). Carrapatos do gênero *Dermatocentor andersoni* atuam como vetores biológicos do CTFV, e pequenos roedores são os reservatórios do vírus. Em seres humanos, a doença manifesta-se sob duas formas clínicas distintas: uma forma branda, caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, como febre, cefaléia, mialgia e leucopenia; e outra mais grave (5% dos casos), na qual podem ser observadas meningoencefalite e febre hemorrágica.

3 Gênero *Orthoreovirus*

Os primeiros vírus dsRNA isolados dos tratos respiratório e entérico de seres humanos e animais, alguns mesmo sem vínculo com doenças conhecidas, foram denominados genericamente *reovírus*. Posteriormente, foram isolados e caracterizados outros vírus com genoma dsRNA segmentado, com características antigênicas, moleculares e clínicas distintas dos reovírus originais (p. ex.: rotavírus e orbivírus) e que, por suas características semelhantes, também foram incluídos na família *Reoviridae*. Com o objetivo de diferenciar os isolados primários (reovírus) dos novos vírus isolados, foi adicionado o sufixo *ortho* aos isolados iniciais de reovírus, que constituíram, então, o gênero *Orthoreovirus*. Os membros deste gênero são comumente chamados de reovírus e assim serão tratados neste texto. Ou seja, a denominação vernacular *reovírus* se refere aos membros do gênero e não aos membros da família *Reoviridae* em geral.

Classicamente, o gênero *Orthoreovirus* é subdividido em duas espécies: ortoreovírus (reovírus) de mamíferos e ortoreovírus (reovírus) aviários. Dentre os reovírus de mamíferos são descritos três sorotipos (1 a 3), e 11 sorotipos já foram identificados entre os reovírus aviários (1

a 11). Com base em análises de seqüências genômicas e de proteínas, novas espécies de *Orthoreovirus* têm sido subseqüentemente descritas. Atualmente são consideradas quatro espécies, além de outras cepas virais em processo de reconhecimento como novas espécies. Algumas das novas espécies, como o reovírus de babuíno, encontram-se filogeneticamente em uma posição intermediária entre os reovírus de mamíferos e os aviários. Como o conhecimento acumulado sobre essas novas espécies e cepas virais ainda é escasso e, principalmente, devido ao impacto ainda não avaliado desses vírus na saúde animal, neste capítulo serão apenas consideradas as duas espécies clássicas de ortoreovírus: mamíferos e aviários.

3.1 Características do vírion e do genoma

As partículas virais dos reovírus de mamíferos e de aves compartilham várias características em comum. Os vírions não-envelopados de simetria icosaédrica apresentam aproximadamente 85 nm de diâmetro (ver Figura 30.1). O genoma dsRNA, com aproximadamente 23.500 pares de bases (bp), é constituído por 10 segmentos que podem ser agrupados em três classes denominadas L (*large*), M (*medium*) e S (*small*), de acordo com a respectiva massa molecular. É possível a separação dos segmentos genômicos por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com a massa. Na classe L, encontram-se os segmentos genômicos 1, 2 e 3 (L1, L2 e L3); na classe M, os segmentos 4, 5 e 6 (M1, M2 e M3) e, na classe S, os segmentos 7, 8, 9 e 10 (S1, S2, S3 e S4).

O genoma dos reovírus codifica 12 proteínas, e oito segmentos codificam apenas uma proteína e dois segmentos codificam duas proteínas cada. Dessas, oito proteínas são estruturais (fazem parte da estrutura do vírion) e quatro são não-estruturais. As proteínas estruturais constituem o capsídeo interno ($n = 4$) e externo ($n = 4$), e as proteínas não-estruturais, presentes apenas nas células infectadas, desempenham importantes funções enzimáticas e regulatórias durante a replicação viral. As proteínas dos reovírus são identificadas por letras gregas, de acordo com a

Tabela 30.2. Vírus do gênero *Orthoreovirus*: segmentos genômicos, proteínas codificadas e sua localização nos vírions.

Genoma			Proteína		
Segmento	Classe	Nucleotídeos	Denominação	Aminoácidos	Localização/função
1	L1	3854	$\lambda 3$	1267	Capsídeo interno, polimerase de RNA dependente de RNA
2	L2	3916	$\lambda 2$	1289	Capsídeo externo, guanilil-transferase, metiltransferase?
3	L3	3901	$\lambda 1$	1275	Capsídeo interno, proteína de ligação ao RNA, metaloproteína
4	M1	2304	$\mu 2$	736	Capsídeo interno, função desconhecida
5	M2	2203	$\mu 1$	708	Capsídeo externo, função na penetração e ativação da transcriptase
6	M3	2241	$\mu NS+$	721	Não-estrutural, liga-se ao RNA, ativa a transcrição secundária
			μNSC	681	Não-estrutural
7	S1	1416	$\sigma 1$	455	Capsídeo externo, liga ao receptor, hemaglutinina, determinante de sorotipo
			$\sigma 1S$	120	Não-estrutural, função desconhecida
8	S2	1331	$\sigma 2$	418	Capsídeo interno, liga-se ao RNA
9	S3	1198	σNS	366	Não-estrutural, liga-se ao RNA
10	S4	1196	$\sigma 3$	365	Capsídeo externo, liga-se ao RNA, atua na tradução

classe de segmentos genômicos e, conseqüentemente, de suas respectivas massas moleculares, como λ (*lambda*) para as proteínas da classe L; μ (*mi*) para a classe M e δ (*sigma*) para a classe S (Tabela 30.2).

3.2 Propriedades gerais

Algumas características das partículas virais, como a ausência de envelope lipoprotéico e a presença de capsídeo duplo, fazem com que os vírions sejam muito estáveis às condições do meio ambiente. Os vírions são estáveis em uma ampla faixa de pH e resistentes a solventes de lipídios, como o éter e o clorofórmio. Também devido à

relativa resistência das partículas virais, desinfetantes comuns, como a formalina, lisol, derivados fenólicos e peróxido de hidrogênio, devem ser utilizados com cautela, pois, dependendo da concentração e do tempo de exposição, os reovírus podem manter a sua viabilidade. O hipoclorito de sódio e o etanol a 95% são os desinfetantes de eleição. Nos processos de desinfecção de instalações e equipamentos, deve-se sempre considerar que os reovírus são primariamente vírus respiratórios e entéricos, e que secreções e excreções são as fontes primárias de contaminação do ambiente, água e alimentos. Os vírions são sensíveis à ação da luz ultravioleta, e essa característica deve ser considerada para o manejo de vazios sanitário em ambientes com incidência de luz solar direta.

Os reovírus podem ser amplificados em uma série de cultivos celulares, tanto de células primárias quanto de linhagem. A maioria dos isolados produz efeito citopático, porém alguns podem ser não-citopáticos. A utilização de enzimas proteolíticas (p. ex.: tripsina) no meio de cultivo aumenta a infectividade das partículas víricas. Os reovírus de mamíferos exibem atividade hemaglutinante, propriedade que é ausente nos reovírus aviários. A presença ou ausência desta propriedade biológica é muito utilizada como indicador nas etapas iniciais de identificação de isolados virais obtidos a partir de casos clínicos.

3.3 *Orthoreovirus* de mamíferos

As infecções por reovírus de mamíferos são muito frequentes, independentemente de região geográfica e do sorotipo viral. Inquéritos soroepidemiológicos em várias espécies animais e também em humanos demonstraram que a taxa de adultos soropositivos é alta (60-85%). Entretanto, os relatos de doença clínica associada com esses vírus são esporádicos. Com isso, presume-se que a grande maioria das infecções é inaparente ou subclínica.

Em humanos, a infecção por reovírus tem sido relacionada com doenças respiratórias e entéricas sem gravidade, tanto em crianças como em adultos e idosos. Os sinais clínicos mais frequentemente relatados incluem cefaléia, mal-estar, rinite, faringite, tosse, espirro e diarreia. Os reovírus de mamíferos já foram, ainda, de forma muito esporádica, implicados em infecções infantis não relacionadas aos sistemas respiratório e digestivo, como atresia biliar extra-hepática neonatal, meningite asséptica, exantema e adenopatia cervical.

Anticorpos anti-reovírus já foram relatados em uma grande variedade de mamíferos domésticos e selvagens. Sinais clínicos são esporadicamente relatados em animais jovens. Em equinos, a infecção tem sido relacionada com sinais clínicos de infecção respiratória, como laringite, rinite e tosse. Conjuntivite também tem sido esporadicamente relatada. Em bovinos, ovinos, suínos, cães e gatos, além de relatos de distúrbios respiratórios, quase sempre secundários, a infec-

ção também tem sido relacionada com ocorrência de diarreia. Em animais, a infecção mais importante por esses vírus ocorre em camundongos e, por isso, essa espécie é muito utilizada em estudos experimentais. Sinais clínicos variados, como diarreia, oleosidade de pele e pêlos, sinais neurológicos (ataxia), hepatite, icterícia, miocardite e pancreatite, são descritos em camundongos natural e/ou experimentalmente infectados com reovírus.

Tanto em animais quanto em seres humanos, infecções bacterianas secundárias e condições imunológicas desfavoráveis, como imunodepressão por qualquer origem, podem complicar o quadro clínico produzido pelas infecções por reovírus, principalmente em hospedeiros jovens e senis.

3.4 *Orthoreovirus* aviários

Os reovírus aviários caracterizam-se pela especificidade de hospedeiro, diversidade antigênica e pela ausência de atividade hemaglutinante na grande maioria dos isolados, o que contrasta com a característica hemaglutinante dos reovírus dos mamíferos. Dentre os reovírus aviários, são descritos 11 sorotipos distintos que, de acordo com a procedência (distribuição geográfica, espécie aviária e material clínico de origem), podem apresentar considerável reatividade sorológica cruzada devido à presença de antígenos comuns. O isolamento dos reovírus aviários pode ser obtido com relativa facilidade, pois o vírus adapta-se a uma série de sistemas, como ovos embrioados de galinha. Nesse sistema, o material deve ser inoculado no saco da gema ou na membrana cório-alantóide. Lesões macro e microscópicas, acompanhadas de morte, caracterizam a infecção dos embriões. Os reovírus aviários podem ser isolados também em cultivo primário de células originadas de embrião de galinha, como fibroblastos, rim, fígado e pulmão. O isolamento viral pode ser monitorado pelo efeito citopático, que se caracteriza pela formação de sincícios, degeneração celular e produção de inclusões intracitoplasmáticas. Células de linhagem contínua (ou estabelecida) de mamíferos também podem ser utilizadas para o isolamento de reovírus aviários,

destacando-se as linhagens derivadas de tecido renal Vero, BHK-21 (células renais de hamster), GBK (célula de rim bovino), CRFK (células de rim felino) e PK (células de rim suíno).

Várias espécies de aves domésticas e silvestres são susceptíveis a esses vírus, porém a infecção assume especial importância em galinhas e perus. Várias condições intercorrentes são necessárias para definir o curso de uma infecção. A presença ou a ausência de sinais clínicos e mesmo o número de aves acometidas estão relacionados com vários fatores, que incluem: a) genética e idade do hospedeiro; b) sorotipo viral e via de infecção; c) infecções bacterianas, parasitárias e virais intercorrentes, incluindo aquelas com características imunodepressoras; d) manejo zootécnico inadequado, acarretando em desconforto e estresse; e) qualidade da ração (composição, presença de micotoxinas); f) falhas no manejo sanitário, entre outros. Essas condições, tanto de forma isolada quanto em associação, podem definir o conceito de doenças ou síndromes multifatoriais e multietiológicas que contribuem com a emergência de novas doenças ou mesmo a reemergência de doenças conhecidas.

Os reovírus aviários têm sido isolados, com maior frequência, de uma variedade de tecidos e órgãos de aves acometidas por várias doenças não-relacionadas, como artrite/tenosinovite, síndrome da refugagem, síndrome da má-absorção, além de aves com problemas respiratórios e entéricos. Em outras condições menos frequentes, também há relatos do isolamento dos reovírus aviários, como associados com ruptura do tendão do gastrocnêmio, osteoporose, pericardite, miocardite, hidropericárdio, empastamento da cloaca, mortalidade de pintinhos. Várias dessas condições clínicas podem ocorrer concomitantemente, como as síndromes da refugagem e da má-absorção, empastamento da cloaca e aumento da taxa de mortalidade de pintinhos. Em contraste, os reovírus aviários também podem ser isolados a partir de aves clinicamente sadias.

A entidade clínica mais bem definida e classicamente atribuída ao reovírus aviário em galinhas e perus é a *artrite viral*. A infecção natural ocorre usualmente em aves jovens (4 a 6 semanas de idade), mas também pode ser observada em

faixas etárias mais avançadas. A taxa de morbidade pode ser de 100%, mas a taxa de mortalidade é relativamente baixa (em média 5%). A evolução pode ser aguda ou crônica, e as aves comprometidas apresentam dor articular, claudicação com conseqüentes dificuldades de locomoção e alimentação. Devido à perda da condição corporal e refugagem, muitas aves são eliminadas do lote. A intensidade dos sinais clínicos e o número de aves comprometidas estão relacionados com a idade da ave e com o sorotipo viral envolvido. Fatores intercorrentes, como infecções mistas com *Mycoplasma synoviae* e falhas nos manejos zootécnico, nutricional e sanitário, também podem agravar a infecção.

Os prejuízos econômicos ocasionados pela reovirose aviária em criações comerciais de frangos de corte e de perus devem-se à incapacidade e definhamento de aves com quadro clínico de artrite/tenosinovite, ao aumento da taxa de mortalidade e à redução da performance geral, incluindo ganho de peso e conversão alimentar. Essas condições ocasionam um aumento da refugagem e perda da aceitação das aves no mercado.

4 Gênero *Rotavirus*

Os rotavírus – membros do gênero *Rotavirus* – são considerados em todo o mundo como um dos principais vírus entéricos tanto para humanos quanto para animais. A maioria das infecções agudas pelos rotavírus caracteriza-se por sua gravidade, sendo, com frequência, acompanhadas de diarreia, desidratação, desequilíbrio eletrolítico e acidose. Os rotavírus estão amplamente disseminados na natureza, e uma gama de hospedeiros é susceptível à infecção, incluindo mamíferos domésticos e silvestres e também as aves. A infecção, quando acomete animais jovens, geralmente é acompanhada de sinais clínicos. Em adultos, infecção com frequência é assintomática, porém esses indivíduos podem ser portadores e transmissores do vírus para indivíduos jovens da mesma espécie. Na dependência da virulência da cepa viral infectante e em hospedeiros com potencial de resposta imunológica comprometido, tanto por infecções imunodepressoras recorrentes quanto pela idade avançada, algumas infec-

ções em adultos podem ser acompanhadas por sinais clínicos de diarreia.

Os rotavírus são predominantemente espécie-específicos, porém infecções heterólogas também são relatadas com grande frequência. As infecções heterólogas são caracterizadas pela infecção de uma determinada espécie animal por um rotavírus de outra espécie, como as infecções humanas causadas por sorotipos e/ou genótipos de rotavírus de suínos e bovinos, e vice-versa. A primeira situação exemplifica o caráter zoonótico da infecção que, até recentemente, não era considerado.

Em animais de produção, a infecção pelos rotavírus assume especial importância epidemiológica e, conseqüentemente, econômica na criação de bovinos, suínos e frangos de corte. O rotavírus é o principal agente etiológico do complexo “diarreia neonatal bovina e suína”, de etiologia multifatorial e multietiológica, envolvendo fatores relacionados ao manejo zootécnico e sanitário, além de microorganismos, como bactérias, protozoários e vírus. A diarreia neonatal em bovinos e suínos é o principal problema sanitário nessa fase da criação. Nos episódios de diarreia neonatal, com alta taxa de morbidade, as principais conseqüências da infecção pelo rotavírus, além dos sinais clínicos, concentram-se em alterações significativas nas taxas de conversão alimentar e ganho de peso e em aumento nos custos de produção e da taxa de mortalidade.

A rotavirose está amplamente disseminada nos rebanhos e/ou plantéis de bovinos, suínos e frangos de corte brasileiros. Nessas três espécies, a infecção é mais freqüente na faixa etária entre a segunda e terceira semanas de vida. Em bovinos, a infecção constitui-se em sério problema sanitário para animais com aptidão para a produção de leite ou para carne, incluindo tanto aqueles rebanhos manejados de forma intensiva quanto extensiva. Com isso, a infecção assume especial importância para a medicina veterinária.

4.1 Classificação

De acordo com as diferenças antigênicas detectadas na VP6, que é a proteína mais abundante dos vírions, os rotavírus podem ser classi-

ficados em sete sorogrupos distintos, designados pelas letras A a G. Os grupos A, B e C têm sido encontrados tanto em humanos quanto em outras espécies animais; enquanto os grupos D a G foram identificados exclusivamente em animais. Dos sete sorogrupos dos rotavírus, somente os grupos A, B e C produzem infecções, que, pela sua frequência, podem ser consideradas de importância clínica e epidemiológica para humanos e animais. A grande maioria dos episódios de diarreia, e mesmo as infecções subclínicas nessas espécies, está associada com os rotavírus do grupo A. A infecção pelo rotavírus grupo B é menos freqüente e, além do homem, já foi relatada em bovinos, suínos, ovinos e roedores. O grupo C de rotavírus tem sido identificado em várias partes do mundo como causador de diarreia em humanos e animais, principalmente suínos. Em bovinos, a identificação do rotavírus grupo C em fezes de animais com diarreia é um evento raro.

Da mesma forma que a classificação em grupos sorológicos, o perfil de migração dos 11 segmentos genômicos de dsRNA em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) também possibilita a classificação dos rotavírus em sete grupos distintos (A-G), denominados eletroferogrupos. As variações observadas no perfil eletroforético das cepas ou isolados de rotavírus classificadas em um mesmo eletroferogrupos são denominadas eletroferotipos.

O padrão eletroforético de migração dos 11 segmentos genômicos dos rotavírus do grupo A, de acordo com a massa molecular de cada segmento, é distribuído em classes constituídas pelos segmentos 1 a 4 (Classe I); 5 e 6 (Classe II); 7, 8, e 9 (Classe III) e os segmentos 10 e 11 (Classe IV). Essa disposição é freqüentemente representada como 4-2-3-2, indicando o número de segmentos genômicos encontrados em cada classe do grupo A. Uma importante característica eletroforética do rotavírus do grupo A é a migração dos segmentos genômicos 7, 8 e 9 em forma de trinca, uma vez que as suas respectivas massas moleculares são muito próximas, podendo em muitas circunstâncias co-migrarem em gel de poliacrilamida (Figura 30.2). Por outro lado, os rotavírus dos grupos B a G, denominados atípicos, não apresentam essa distribuição característica em forma de trinca.

Contudo, o perfil genômico obtido por meio da migração em PAGE (eletroferotipo) não deve ser utilizado como único método de classificação dos rotavírus, pois alterações no genoma viral, como rearranjos e deleções, podem resultar em alterações no padrão de migração dos segmentos.

Além da classificação dos rotavírus em sorogrupos (de acordo com a reatividade sorológica com a VP6), as proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7 ou os segmentos genômicos que as codificam permitem a caracterização das amostras de rotavírus em sorotipos e/ou genótipos. Dessa forma, os rotavírus possuem um sistema binário de classificação, constituído por tipos de VP4 (P tipos – protease sensível) e tipos de VP7 (G tipo – glicoproteína). Atualmente, por meio de técnicas sorológicas e/ou moleculares, são descritos mais

de 27 diferentes tipos de P (VP4) e 15 tipos de G (VP7). Entre as mais de 405 combinações possíveis entre os diferentes genótipos P (27) e G (15), algumas são mais frequentes.

4.2 Propriedades dos vírions, estrutura e organização genômica

Os *vírions* medem aproximadamente 85 nm de diâmetro e não possuem envelope. A denominação *Rotavirus* surgiu da palavra de origem latina *rota*, que significa roda, devido à aparência das partículas virais quando observadas sob microscopia eletrônica (ME) (Figura 30.1). O capsídeo viral é formado por três camadas protéicas concêntricas de simetria icosaédrica, denominadas capsídeo externo, intermediário e interno

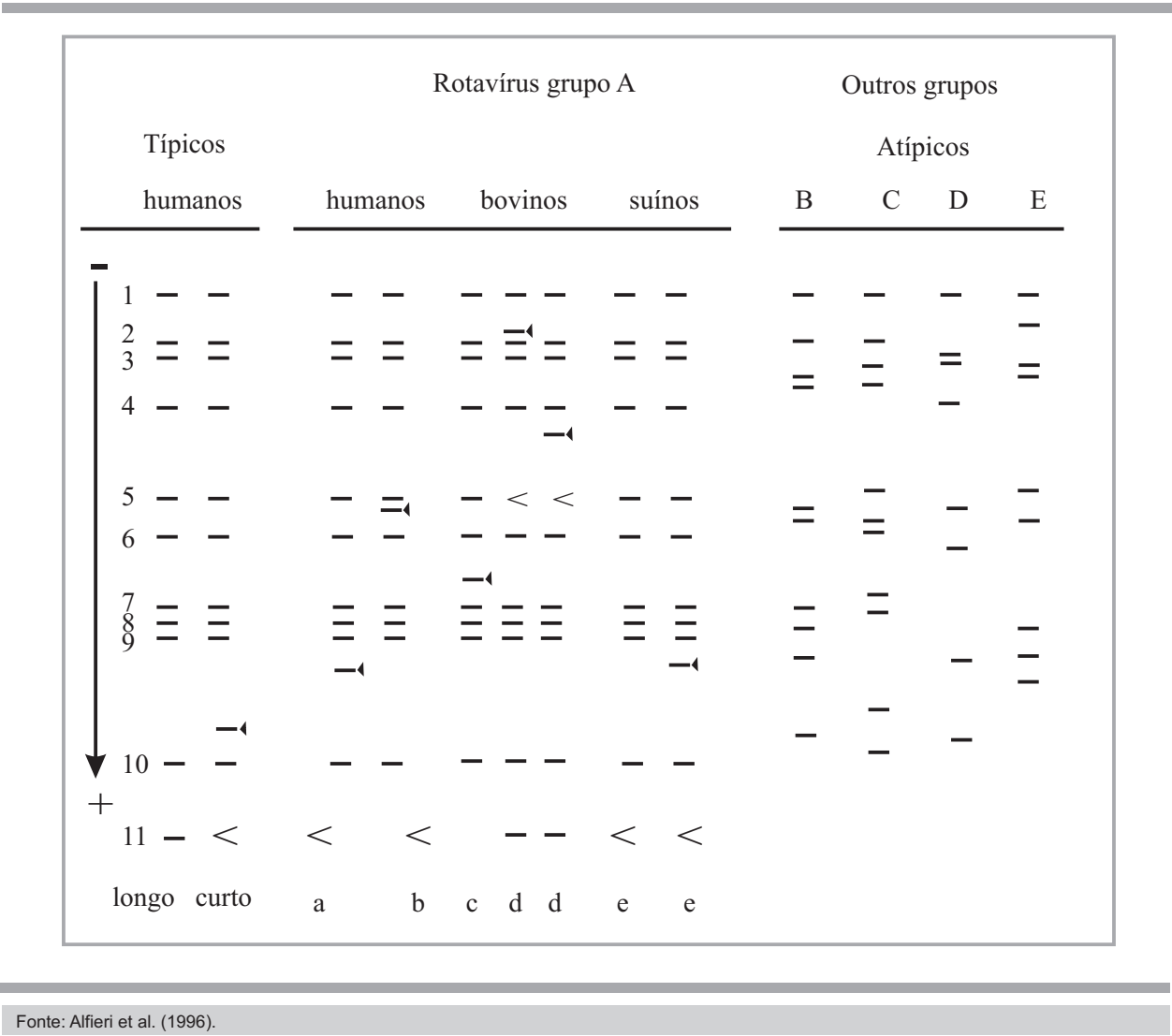


Figura 30.2. Ilustração esquemática do padrão de migração dos segmentos genômicos dos rotavírus pertencentes aos eletroferogrupos A a E, após eletroforese em gel de poliacrilamida.

(Figura 30.3). De acordo com a sua composição protéica e estrutura, três tipos de partículas víricas podem ser visualizadas sob ME. As partículas completas apresentam todo o conjunto de proteínas estruturais, distribuídas em três camadas protéicas (Figura 30.3A). Partículas contendo apenas duas camadas protéicas, que podem ser obtidas experimentalmente pela remoção da VP4 e VP7 por métodos químicos, também são observadas, porém não são infecciosas (Figura 30.3B). A remoção da VP6, que também pode ser obtida *in vitro*, resulta em partículas menores, não-infecciosas, compostas apenas pelo núcleo ou *core* (Figura 30.3C).

No interior do núcleo, encontra-se o genoma viral, constituído por 11 moléculas de dsRNA. Cada um dos 11 segmentos genômicos codifica pelo menos uma proteína viral, totalizando seis proteínas estruturais e seis proteínas não-estruturais. Estudos com a estirpe SA11 do rotavírus símio identificaram uma sexta proteína não-estrutural, codificada pelo segmento 11 do genoma, sendo este o único segmento que codifica mais de uma proteína. A Figura 30.4 apresenta a estrutura esquemática do vírion, os segmentos genômicos e as proteínas codificadas por cada segmento.

Os vírions contêm a atividade de RNA polimerase dependente de RNA e as demais fun-

ções enzimáticas necessárias para a replicação viral. As proteínas estruturais são designadas VP (*viral protein*), seguidas por número sequencial na ordem decrescente da massa molecular. No *core* ou núcleo, estão presentes as proteínas VP1 (125kDa), VP2 (94kDa) e VP3 (88kDa); no capsídeo intermediário, a VP6 (46kDa); e, no capsídeo externo, as proteínas VP4 (88kDa) e VP7 (38kDa). As proteínas não-estruturais, encontradas nas partículas virais maduras, recebem a denominação NSP (*non-structural protein*).

No *core* ou núcleo viral, as proteínas VP1 e VP3 estão diretamente associadas com o genoma. A proteína VP2, com 120 moléculas por vírion, é a mais abundante do núcleo. A proteína VP1 possui atividade de RNA polimerase RNA-dependente, e a proteína VP3 possui atividade de guanililtransferase, estando envolvida na adição da estrutura 5'-*cap* aos RNAs mensageiros (mRNAs). O capsídeo intermediário é formado por 780 moléculas da proteína estrutural VP6, organizadas em 260 unidades triméricas. O capsídeo externo é composto por duas classes de proteínas, VP4 e VP7, que são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira. A superfície externa do vírus apresenta 780 cópias da glicoproteína VP7, em arranjos triméricos, e 120 cópias da proteína VP4, que formam 60 estru-

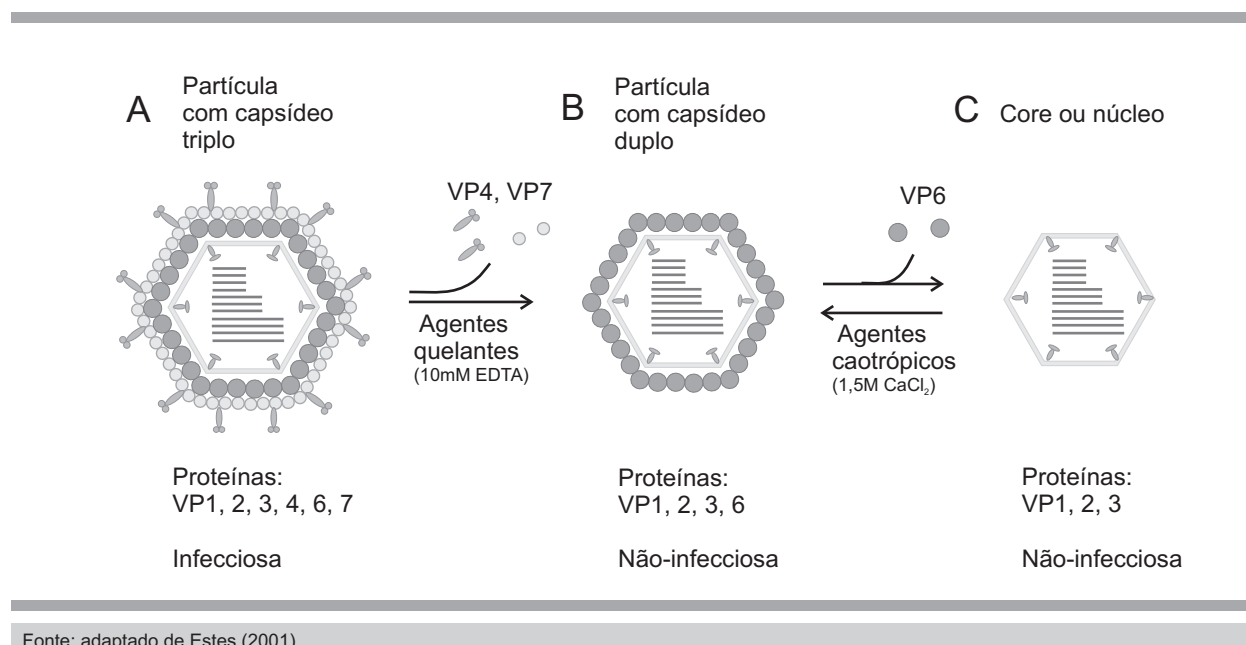
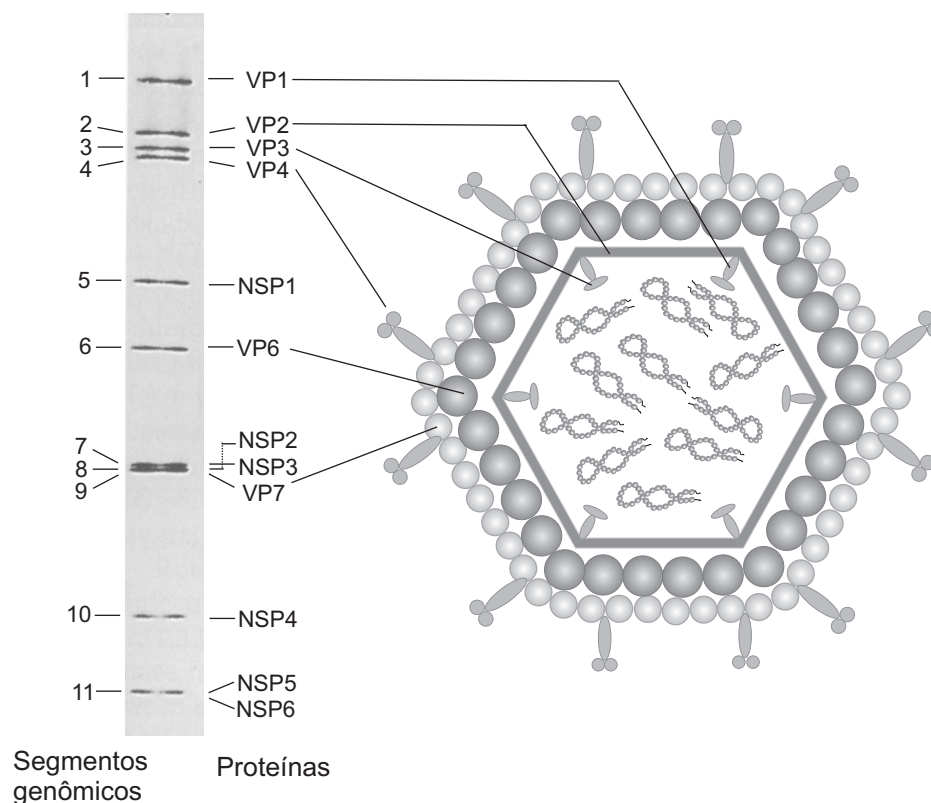


Figura 30.3. Ilustração esquemática da estrutura dos três tipos de partículas víricas dos rotavírus que podem ser visualizadas sob ME.



Fonte: adaptado de Estes (2001).

Figura 30.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida, mostrando os segmentos genômicos (dsRNA) dos rotavírus (esquerda); as proteínas codificadas por cada segmento (centro) e uma ilustração simplificada de uma partícula vírica e os seus componentes (direita). Os segmentos estão numerados com base na migração do genoma do rotavírus grupo A da cepa Sa11.

ras diméricas semelhantes a espículas. A proteína VP4 contém um sítio de clivagem pela tripsina e, quando submetida ao tratamento *in vitro* com protease, gera dois produtos: as proteínas VP5 e VP8, que aumentam a infectividade do vírus. Os genes dos rotavírus, com os seus respectivos produtos e funções, estão apresentados na Tabela 30.3.

Os rotavírus são os únicos vírus conhecidos de mamíferos e aves que possuem 11 segmentos de dsRNA como genoma. A extensão de cada um dos 11 segmentos genômicos varia entre 600 e 3.000 pb, e o genoma completo apresenta aproximadamente 18.600 pb. É essa diferença de tamanho que possibilita que os segmentos genômicos apresentem um perfil de migração característico e único para os rotavírus quando separados por PAGE.

O protótipo símio SA11 foi o primeiro rotavírus a ter o genoma completamente sequenciado. As extremidades 5' das fitas genômicas de polaridade positiva possuem uma estrutura *cap*, mas diferentemente da maioria dos mRNA celulares, não possuem as extremidades 3' poliadeniladas. Todos os genes dos rotavírus estão flanqueados por regiões traduzidas de extensão variável próximo as extremidades 5' e 3'. Em todos os segmentos, essas sequências não-traduzidas flanqueiam uma única sequência aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), com exceção do segmento 11, que possui duas ORFs. Quase todos os mRNA terminam com a sequência consenso 5'-UGUGACC-3', sugerindo que se constituam em sinais importantes para a transcrição, transporte do RNA e replicação e/ou encapsidação dos segmentos genômicos.

Tabela 30.3. Características dos segmentos genômicos e proteínas codificadas pelo genoma segmentado dos rotavírus

Gene	Proteína	Massa (Da)	Localização nas partículas	Número de cópias	Funções
1	VP1	125.005	Nucleocapsídeo	12	RNA polimerase RNA-dependente.
2	VP2	102.431	Nucleocapsídeo	120	União ao RNA; forma o nucleocapsídeo.
3	VP3	98.120	Nucleocapsídeo	12	Guanililtransferase; metiltransferase; proteína básica.
4	VP4	86.782	Capsídeo	120	Proteína de união à célula; interage com VP6; antígeno neutralizante P-tipo. Infectividade aumenta após clivagem pela tripsina, formando as proteínas Vp5 e VP8.
		60.000	Produto da clivagem de VP4		
		28.000	Produto da clivagem de VP4		
5	NSP1	58.654	Proteína não-estrutural	0	Associa-se ao citoesqueleto; interage com fator 3 regulatório de IFN.
6	VP6	48.16	Capsídeo	780	Proteína estrutural do capsídeo intermediário; antígeno de subgrupo.
7	NSP3	34.600	Proteína não-estrutural	0	Envolvida na regulação da tradução.
8	NSP2	34.700	Proteína não-estrutural	0	Acumula-se em viroplasmas; atividade NTPase; liga-se à NSP5 e Vp1.
9	VP7	7.368	Capsídeo externo	780	Glicoproteína estrutural do capsídeo externo; antígeno neutralizante G-tipo.
10	NSP4	20.290	Proteína não-estrutural	0	Enterotoxina; receptor para partículas.
11	NSP5	21.725	Proteína não-estrutural	0	Possível cinase autocatalítica; interage com VP2, NSP2 e NSP6.
	NSP6	11.012	Proteína não-estrutural	0	Produto do ORF2 do gene 11; interage com NSP5; localizada em viroplasmas.

O ressortimento (*reassortment*) – uma forma de recombinação genética – dos rotavírus pode ocorrer quando uma célula é co-infectada por duas cepas virais distintas, de forma que a progênie viral será constituída por uma população contendo diferentes combinações dos genes parentais. A ocorrência desse fenômeno de variabilidade genética é permitida pela homologia da sequência consenso (5'-UGUGACC-3') entre todos os segmentos do genoma viral.

Os rotavírus são relativamente estáveis em condições ambientais, mantendo a sua infectividade na faixa de pH entre 3 e 9. Amostras virais isoladas de bezerros permaneceram infectivas durante vários meses a 4°C ou mesmo a -20°C quando estabilizadas em 1,5 mM CaCl₂. A ausência de lipídeos na estrutura dos vírions justifica a resistência desses vírus aos solventes orgânicos, tais como: éter, clorofórmio ou freón. Pelos efeitos

deletérios que ocasionam na camada externa do vírion, a formalina, o cloro, a betapropiolactona, o etanol a 95% e o glutaraldeído são considerados desinfetantes eficientes para esses vírus.

A complexidade molecular e antigênica dos rotavírus é decorrente da diversidade genômica gerada por três mecanismos genéticos básicos: mutações pontuais, ressortimento e rearranjos genômicos. As mutações pontuais consistem em alterações na sequência de nucleotídeos que ocorrem durante a replicação do genoma e que acarretam substituições de aminoácidos das proteínas. Essas mutações podem alterar os sítios antigênicos, resultando em cepas resistentes aos anticorpos neutralizantes produzidos contra as cepas parentais. O ressortimento é uma forma de recombinação que ocorre em vírus com o genoma segmentado, decorrentes da troca de segmentos genômicos por cepas diferentes por ocasião de

uma co-infecção de uma célula. Por meio desse mecanismo, novas cepas virais podem surgir rapidamente. A co-infecção celular por cepas geneticamente próximas pode promover naturalmente o mesmo fenômeno de forma mais eficiente. As alterações na sequência de nucleotídeos, identificadas em porções importantes de um segmento genômico, muitas vezes na forma de deleções ou duplicações, são denominadas de rearranjo. Tais alterações determinam modificações na massa molecular dos segmentos de dsRNA, resultando em um perfil eletroforético ou eletroferotipo, distinto da cepa original.

4.3 Replicação

O mecanismo de replicação dos rotavírus tem sido elucidado a partir de estudos realizados em células da linhagem contínua MA-104 (células renais de macaco rhesus). Esta linhagem celular é uma das mais permissivas à infecção pelos rotavírus e tem sido amplamente utilizada para a caracterização desses vírus.

O monitoramento dos estágios iniciais da replicação viral por ME revela que somente as partículas com o capsídeo triplo, contendo a VP4 íntegra, são capazes de penetrar produtivamente nas células hospedeiras. A adsorção viral à superfície celular é mediada pela VP4 ou por seu produto de clivagem (VP5). Alguns estudos apontam também a participação da VP7 nas ligações vírion-célula. Entretanto, a penetração dos rotavírus nas células hospedeiras parece iniciar com um processo complexo, que necessita da interação dessas duas proteínas (VP4 e VP7) para estabelecer a ligação inicial.

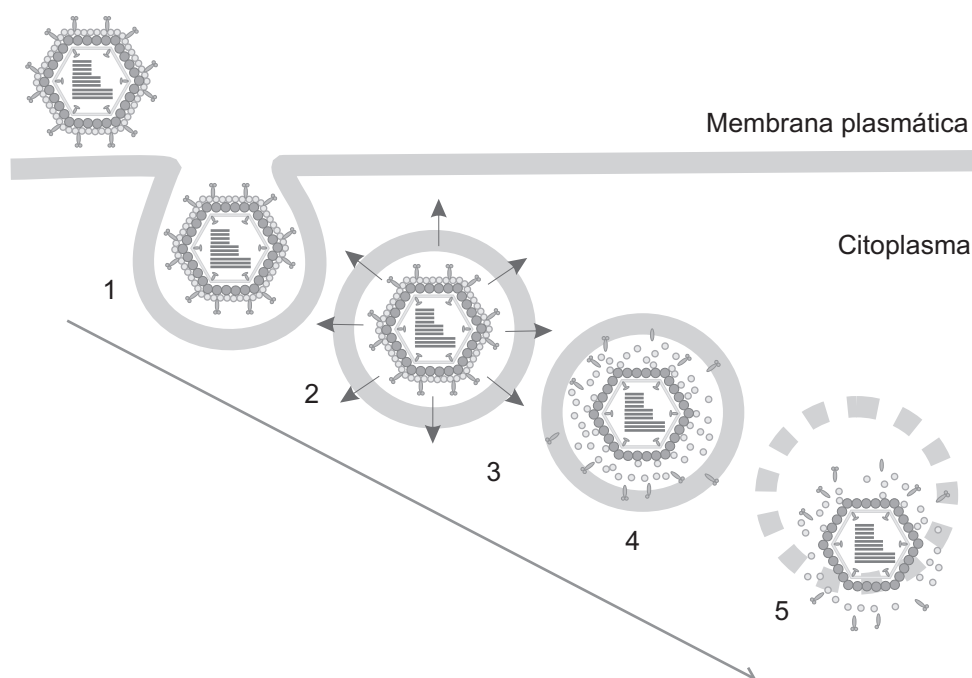
A infecção *in vivo* pelo rotavírus está restrita a células do topo das vilosidades do intestino delgado, o que sugere a existência de receptores específicos nessas células. A infecção *in vitro* também é limitada a linhagens celulares epiteliais de origem intestinal e renal. Embora grandes avanços no conhecimento da biologia molecular e estrutural dos rotavírus já tenham sido obtidos, pouco é conhecido sobre os seus prováveis receptores. A infectividade de algumas cepas de rotavírus de origem animal depende da presença de ácido siálico (AS) na superfície celular. Entretanto, esta interação parece não ser essencial, uma

vez que já foram identificadas moléculas na superfície celular resistentes a neuraminidase (AS-independentes), que interagem com a maioria das cepas de rotavírus de origem humana e algumas de origem animal. Portanto, tem sido proposto que existam, pelo menos, dois receptores para o rotavírus: os AS-dependentes (gangliosídeos) e os AS-independentes (integrinas). Estudos recentes sugerem uma interação inicial dos vírions com o receptor AS-dependente, seguida por uma segunda interação com um receptor AS-independente. Aparentemente a ligação com o segundo receptor é mais específica. A interação inicial é dependente de concentrações de sódio e ocorre na faixa de pH compreendida entre 5,5 e 8.

Após a interação do vírion com os receptores celulares, a partícula viral penetra no citoplasma celular por um mecanismo ainda não completamente conhecido. Entre os mecanismos propostos, destacam-se a penetração direta através da membrana plasmática após a clivagem proteolítica de VP4 e exposição do peptídeo de fusão VP5; e a penetração após internalização por endocitose (Figura 30.5).

Estudos realizados com a cepa OSU do rotavírus suíno confirmam a internalização dos vírions por endocitose, mediada por receptor específico, e sugerem que o desnudamento pode ocorrer pela ação de enzimas lisossomais. A endocitose constitui um modelo de entrada cálcio-dependente, sendo que a ligação aos receptores celulares induz a formação de uma vesícula endocítica que isola a partícula de capsídeo triplo em um compartimento intracelular. A redução da concentração de cálcio no interior da vesícula endossomal ocorre por meio de difusão simples e pode provocar alterações conformacionais no capsídeo, com a solubilização das proteínas do capsídeo externo. Com a liberação dos peptídeos do capsídeo externo, ocorre o rompimento da membrana lisossomal, permitindo a penetração da partícula subviral, isenta do capsídeo externo, no citoplasma (Figura 30.5). Nesse momento, ocorre a ativação da transcriptase viral, dando início à transcrição dos segmentos genômicos.

O ciclo replicativo ocorre integralmente no citoplasma, independente de estruturas e mecanismos nucleares. A síntese dos mRNA virais é modulada pela enzima viral RNA polimerase



Fonte: adaptado de Ruiz et al. (2000).

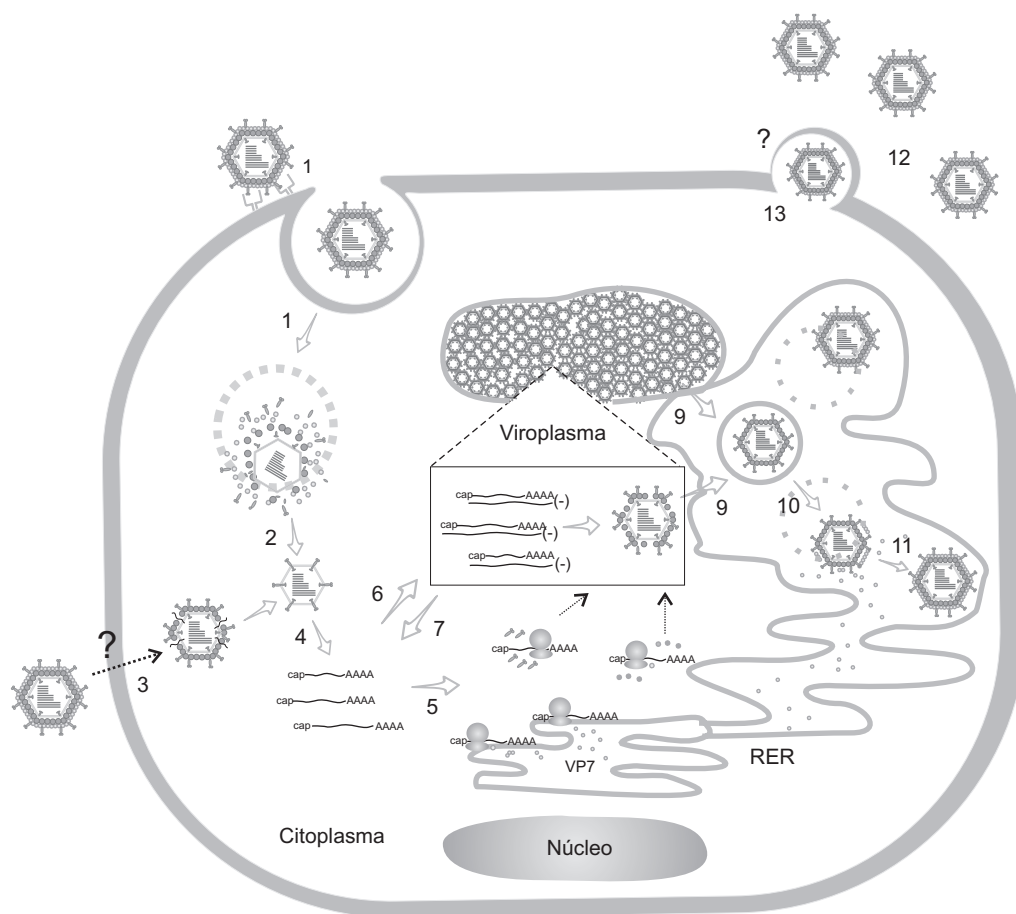
Figura 30.5. Modelo para a penetração dos rotavírus em células suscetíveis, por meio de endocitose cálcio-dependente. 1) Internalização por endocitose; 2) Efluxo de íons cálcio do interior das vesículas; 3) Baixa na concentração de Ca^{++} e acidificação das vesículas; 4) Solubilização do capsídeo externo (VP5, 7 e 8); 5) Permeabilização da membrana, lise da vesícula endocítica, liberação das partículas com duplo capsídeo no citosol.

RNA-dependente (VP1). Os mRNA recém-transcritos cumprem basicamente duas funções: atuam como mensageiros para a tradução das proteínas virais e atuam como molde para a síntese do dsRNA que constituirá o genoma da progênie viral. A transcrição é assimétrica: todos os transcritos sintetizados são fitas de polaridade positiva que utilizam como molde as fitas negativas dos RNAs genômicos. À medida que se processa a síntese e o acúmulo das proteínas virais (VPs e NSPs), grandes inclusões citoplasmáticas, denominadas viroplasmas, são formadas no citoplasma das células infectadas.

Tem sido sugerido que todo o processo de replicação do genoma e a formação das partículas subvirais com duplo capsídeo, formadas pela VP2 e VP6, ocorra no interior dos viroplasmas. Embora grande parte da tradução dos mRNA ocorra nos ribossomos livres, as glicoproteínas VP7 (capsídeo externo) e NSP4 são sintetizadas nos ribossomos associados à membrana do re-

tículo endoplasmático rugoso (RER), onde são processadas e inseridas na membrana. Dessa forma, todas as proteínas se acumulam no viroplasma, com exceção da VP7 e NSP4 que se localizam no RER, e das proteínas não-estruturais NSP1 e NSP3, que se encontram distribuídas no citoplasma, em associação com as fibras do citoesqueleto.

A morfogênese das partículas víricas é um processo complexo que ocorre de forma coordenada com a replicação. Nesse processo, ocorre a formação de pelo menos três estágios intermediários de replicação, que são os precursores das partículas de duplo capsídeo. Após a formação das partículas com duplo capsídeo, elas passam do viroplasma para o interior do RER adjacente. A maturação final é dependente de altas concentrações de cálcio para promover a estabilização das proteínas do capsídeo externo. Durante a passagem pelo RER as partículas virais adquirem uma bicamada lipídica temporária. O envelope



Fonte: adaptado de Estes (2001).

Figura 30.6. Ciclo replicativo dos rotavírus. A internalização ocorre por endocitose mediada por receptor (1), e a penetração ocorre após a desestabilização da partícula vírica e permeabilização da membrana endocítica desencadeadas pelo efluxo de cálcio (2). A penetração direta através da membrana também tem sido proposta (3). A transcrição primária ocorre ainda no interior de partículas semi-integras (4) e resulta na produção de mRNA para a síntese proteica (5) e para a replicação do genoma (6). A replicação do genoma (6, 7) e os estágios iniciais da morfogênese (8) ocorrem no interior de estruturas denominadas viroplasma, que contém RNAs e proteínas virais e partículas víricas em formação. As partículas com duplo capsídeo formadas no viroplasma adquirem um envelope lipídico temporário ao penetrarem no RER (9). A remoção do envelope (10) é seguida da adição da VP7, formando o capsídeo externo e estabilizando as partículas (11). Acredita-se que os vírions maduros sejam liberados por lise celular (12), embora outros mecanismos já tenham sido propostos (13).

lipídico é removido no interior do RER por ação coordenada da NSP4. Em seguida, a VP7 (capsídeo externo) é adicionada para formar a partícula viral madura (triplo capsídeo). Estudos por ME têm demonstrado que, ao final do ciclo replicativo, a progênie viral é liberada por lise celular. A Figura 30.6 apresenta uma ilustração esquemática do ciclo replicativo dos rotavírus.

4.4 Enfermidades causadas por rotavírus

A primeira descrição dos rotavírus em animais foi realizada, em 1969, por Mebus e colaboradores, que demonstraram a presença de partículas virais em fezes de bezerros com diarreia. Woode, Jones e Bridger (1975) realizaram o

primeiro relato de rotavírus em fezes diarreicas de leitões. Desde então, os rotavírus têm sido identificados como uma das principais etiologias virais de diarreia em animais jovens de diversas espécies de mamíferos e aves. Em medicina veterinária, importância especial é atribuída aos animais de interesse econômico, principalmente os suínos, bovinos, ovinos e eqüinos. Os animais de companhia e/ou laboratório, como cães, gatos, coelhos, ratos e camundongos, também são susceptíveis à infecção pelo rotavírus. As rotaviroses também representam um problema sanitário em aves comerciais, principalmente em frangos de corte e perus.

As taxas de morbidade e mortalidade e os prejuízos econômicos ocasionados pelas rotaviroses em espécies de importância veterinária são variáveis. Em bovinos, a diarreia causada pelos rotavírus é reconhecidamente uma das principais causas de perdas econômicas no período entre o nascimento e o desmame. Estudos epidemiológicos, realizados no Brasil, Estados Unidos, Canadá, Índia, Austrália e países europeus, indicam que as infecções por rotavírus apresentam morbidade com taxas de 8 a 36%, e a mortalidade pode atingir de 3 a 6% dos animais jovens. Bezerros na segunda ou terceira semanas de vida são os mais susceptíveis.

Em leitões, as diarreias constituem o principal problema de ordem sanitária que ocorre tanto em animais lactentes (maternidade) quanto em recém-desmamados (creche). Em todos os países onde a suinocultura é explorada de forma intensiva, os rotavírus são identificados como um dos mais importantes agentes infecciosos causadores de diarreia nos períodos do pré e pós-desmame.

O primeiro mês de vida dos animais tem sido apontado como o período mais crítico para a ocorrência das rotaviroses. Após esse período, a frequência de episódios de diarreia por esses vírus declina vertiginosamente. A maior susceptibilidade dos animais neonatos é explicada pelo fato de que a reposição do epitélio apical das vilosidades ocorre de forma mais lenta, facilitando o desenvolvimento completo do ciclo replicativo e a produção de progênie viral. Os animais adultos tornam-se resistentes à doença porque a re-

posição dos enterócitos é mais intensa e compete com a replicação viral, de forma que somente as cepas virais muito virulentas podem causar diarreia em bezerros com idade superior a seis semanas. A doença clínica também não é frequente durante a primeira semana de vida do animal, provavelmente devido à transmissão passiva dos anticorpos maternos e conseqüente neutralização do vírus.

Diferentemente de outras infecções entéricas, em especial as bacterianas e parasitárias, as medidas de caráter higiênico-sanitário adotadas isoladamente não são capazes de reduzir significativamente o número de casos clínicos de rotaviroses. Algumas características peculiares dos rotavírus fazem com que as rotaviroses se manifestem de forma diferente de outras doenças entéricas, determinando um grande impacto na sanidade animal, até mesmo em rebanhos de propriedades altamente tecnificadas. Dentre essas características, destacam-se: a) resistência dos vírions às condições ambientais e aos produtos químicos utilizados em desinfecção; b) alta concentração de partículas virais excretadas no período agudo da doença (10^{11} partículas por grama de fezes); c) presença de infecções subclínicas e de adultos portadores assintomáticos; d) grande variedade de hospedeiros; e) possibilidade de transmissão entre espécies (infecções heterólogas); e f) caráter endêmico da infecção. Medidas relativas aos aspectos nutricionais e de caráter higiênico-sanitário não foram capazes de reduzir significativamente a incidência e a gravidade das infecções por rotavírus.

As infecções por rotavírus são amplamente disseminadas nas populações humanas e animais susceptíveis. A distribuição dos sorotipos e/ou eletroferotipos de cada espécie viral, no entanto, pode apresentar variações, de modo que determinadas regiões apresentem determinados sorotipos em contraste com outras regiões que podem apresentar a circulação de sorotipos diferentes. Os altos títulos em que o vírus é excretado, o período de excreção, a existência de portadores e a alta resistência dos vírions no ambiente contribuem para essa ampla disseminação.

4.4.1 Patogenia e sinais clínicos

A transmissão dos rotavírus ocorre principalmente pela via fecal-oral, por meio de partículas virais encontradas no ambiente, na água e nos alimentos contaminados pelas fezes. Após a ingestão, as partículas virais alcançam a luz intestinal. Os rotavírus possuem tropismo marcante pelas células do intestino delgado. Os vírions penetram nos enterócitos maduros, localizados na região apical das vilosidades intestinais. Além da capacidade absorptiva, os enterócitos maduros ou do ápice das vilosidades desempenham também função digestiva com a secreção da enzima lactase.

A partir desse momento, é iniciado o ciclo replicativo no interior dos enterócitos, culminando com a lise e descamação do epitélio intestinal. Os vírions liberados, após a descamação celular, irão infectar novos enterócitos, contribuindo para a propagação da infecção. O vírus é excretado nas fezes por até sete dias pós-infecção. Em decorrência da grande injúria tecidual, a reposição celular é feita por células cubóides, imaturas do ponto de vista estrutural e funcional, provenientes das criptas intestinais que não são afetadas diretamente pela infecção. Embora as células imaturas sejam refratárias à infecção viral, o que confere à infecção a característica autolimitante, elas perdem a capacidade absorptiva e digestiva.

Com base nos mecanismos fisiopatológicos, a diarreia ocasionada pelo rotavírus também é conhecida como diarreia por má absorção. Por deficiência da enzima lactase, ocorre falha na digestão da lactose. Associada com a má absorção, a lactose não digerida entra em fermentação por ação de bactérias, intensificando a diarreia devido ao aumento da pressão osmótica na luz intestinal. Por esses eventos, as infecções pelos rotavírus são freqüentemente denominadas “curso branco”, devido à presença de leite não digerido nas fezes diarreicas.

Em consequência das lesões no epitélio, os mediadores da reação inflamatória comprometem também as células das criptas; e a motilidade intestinal pode estar inibida durante a maioria dos casos de diarreia. Quando o número de enterócitos infectados excede o da reposição celular,

as vilosidades atrofiam-se, podendo fusionar-se nos casos mais graves. Após o período médio de incubação de 16 a 24 horas, surgem os primeiros sinais de diarreia. Além da diarreia, outros sinais clínicos não-específicos das síndromes diarreicas incluem: depressão, anorexia, vômito, desidratação, pêlo eriçado e sinais inerentes à acidose metabólica. Animais jovens podem morrer em consequência da desidratação ou da infecção bacteriana secundária, mas a maioria se recupera em três a quatro dias.

Estudos realizados em camundongos demonstraram que a proteína não-estrutural NSP4 pode atuar como uma enterotoxina e induzir diarreia quando administrada pela via intraperitoneal ou intraluminal. Nesse caso, o mecanismo fisiopatológico envolvido na evolução do quadro diarreico ocorreria de forma semelhante a enterotoxina da *Escherichia coli*. A NSP4 interage com um receptor celular do epitélio intestinal, ativando uma via sinalizadora da tradução, que aumenta os níveis de Ca_2^+ intracelular. O Ca_2^+ induz o aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao cloro, que é, então, secretado. Esses eventos caracterizam um quadro de diarreia por hipersecreção. A proteína NSP4 pode, ainda, participar da ativação do sistema nervoso entérico, que estimula e aumenta a secreção de água pelas células intestinais.

Apesar dos rotavírus serem espécie-específicos, a transmissão interespecie também é possível. Vários estudos têm encontrado evidências antigênicas e moleculares de recombinação (ressortimento) *in vivo* de diferentes cepas de rotavírus do grupo A provenientes de humanos e de animais. Cepas virais que são geneticamente muito relacionadas com rotavírus de origem bovina, suína, canina, felina e inclusive aviária, têm sido isoladas de crianças com infecções sintomáticas ou assintomáticas e nosocomiais. Reciprocamente, combinações genotípicas, comumente associadas com cepas de rotavírus do grupo A de origem humana, estão sendo identificadas em animais.

4.4.2 Imunidade

Os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta às infecções pelos rotavírus ainda não estão totalmente esclarecidos. A imunidade

de mucosas, mediada por imunoglobulinas da classe A (IgA secretora), parece constituir a principal defesa orgânica contra as infecções intestinais causadas por esses vírus.

As proteínas do capsídeo intermediário (VP6) e externo (VP4 e VP7) e a proteína não-estrutural NSP4 induzem a formação de anticorpos neutralizantes, principalmente IgG. Entretanto, a função específica desse isotipo de imunoglobulina na proteção contra a infecção ainda não está claramente definida. Experimentos conduzidos em cordeiros neonatos gnotobióticos sugeriram que os anticorpos presentes na luz do intestino delgado foram os determinantes primários da resistência à infecção pelo rotavírus, enquanto os anticorpos circulantes falharam na proteção. Também foi observada a participação efetiva de IgG neutralizantes de origem materna na proteção de animais neonatos contra a doença clínica.

A importância da imunidade celular na resposta imunológica contra a infecção pelo rotavírus tem sido amplamente estudada em camundongos, utilizados como modelos experimentais. Nesses animais, tem sido demonstrado que: a) anticorpos rotavírus-específicos são de importância primária na proteção contra a reinfecção; b) cepas homólogas de rotavírus são muito mais potentes na indução de resposta imune humoral local do que cepas heterólogas; c) os linfócitos T CD8⁺ desempenham função principal na resolução da enfermidade, embora, de forma menos efetiva, também seja demonstrada a participação de linfócitos T CD4⁺; d) citocinas e células NK (*natural killer*) também estão envolvidos na eliminação do vírus. Em síntese, a imunidade celular pode estar muito mais relacionada com a recuperação da enfermidade do que com a prevenção da reinfecção.

Em paralelo à demonstração que a proteína não-estrutural NSP4 pode atuar como enterotoxina viral e ocasionar diarreia em ratos experimentalmente inoculados, também foi observado que essa proteína estimula as respostas humoral e celular, com a participação de linfócitos T citotóxicos. Embora existam evidências de que a resposta imunológica induzida pela NSP4 não seja fundamental para o controle da infecção, as novas descobertas nesse campo são fundamentais para

o entendimento dos fatores imunológicos envolvidos, bem como para a definição das diretrizes para o desenvolvimento de vacinas eficazes.

4.4.3 Diagnóstico

Devido à semelhança com os sinais clínicos de infecções entéricas causadas por outros enteropatógenos, como bactérias, protozoários e vírus, o diagnóstico definitivo das rotavirose depende essencialmente da realização de testes laboratoriais. A ME é muito eficiente na detecção do vírus, uma vez que a morfologia típica dos rotavírus permite a sua identificação sem a necessidade do uso de soro hiperimune (imunomicroscopia eletrônica). A ME é também frequentemente utilizada com o objetivo de solucionar os resultados discrepantes de outros métodos de diagnóstico. Entretanto, essa técnica mostra-se inviável quando o diagnóstico envolve um grande número de amostras a serem analisadas.

O isolamento viral em cultivo celular tem pouco valor prático para o diagnóstico, particularmente por ser uma técnica laboriosa, demorada e exigir a manutenção de linhagens celulares, que torna o procedimento oneroso. As linhagens celulares rotineiramente empregadas para o isolamento do rotavírus incluem a MA-104b e HT 29 (célula de tumor retal humano). Embora não seja utilizada como técnica de diagnóstico de rotina, o cultivo do rotavírus é um método indispensável para o desenvolvimento de estudos relacionados às características antigênicas e moleculares das cepas virais e para a produção de antígenos empregados no diagnóstico e na elaboração de vacinas.

Outros métodos também já foram padronizados para a detecção do rotavírus, como a fixação de complemento, imunofluorescência (IFA), radioimunoensaio (RIA), hemaglutinação (HA) e aglutinação em látex. Os testes imunoenzimáticos (ELISA) constituem um dos métodos mais difundidos no diagnóstico da rotavirose animal devido ao seu limiar de detecção, facilidade de execução, baixo custo e rapidez na obtenção dos resultados. Vários testes de ELISA com anticorpos de captura foram desenvolvidos para o diagnóstico do rotavírus grupo A. *Kits* de ELISA, em

escala comercial, estão disponíveis. Embora a técnica de ELISA seja altamente sensível, de fácil execução e apropriada para o processamento de um grande número de amostras, o sucesso do diagnóstico é diretamente dependente da qualidade dos anticorpos empregados.

O genoma segmentado, característico dos rotavírus, permite a aplicação da técnica de PAGE para a identificação desse vírus. Contudo, apesar de ser eficiente na definição do grupo ou do eletroferogruppo, a PAGE não possibilita a definição do sorotipo viral. Cepas de rotavírus de um mesmo sorotipo podem apresentar perfis eletroforéticos distintos, e cepas do mesmo eletroferotipo podem pertencer a diferentes sorotipos. Os grupos B e E, encontrados em suínos, por exemplo, apresentam eletroferotipos com a mesma distribuição e são antigenicamente diferentes. Dessa forma, a eletroferotipagem não deve ser o único critério para a classificação dos grupos de rotavírus.

Os métodos moleculares, tais como a hibridização e a amplificação gênica por RT-PCR estão sendo aplicados para a genotipagem de cepas de rotavírus grupo A. Devido à boa correlação com a especificidade antigênica, relacionada aos sorotipos, a genotipagem passou a ser utilizada como uma técnica alternativa à sorotipagem. Além da genotipagem, que possibilita a caracterização dos genótipos G e P das cepas de rotavírus do grupo A circulantes em uma região ou período, a RT-PCR pode ser também utilizada com muita eficiência para o diagnóstico das infecções ocasionadas pelos rotavírus grupos B e C.

A utilização de RT-PCR multiplex permite, ainda, a identificação de infecções mistas, como aquelas ocasionadas por cepas de rotavírus pertencentes a diferentes genótipos, e também de infecções heterólogas, ocasionadas por recombinação genética, nas quais são identificadas associações de genótipos G e P não características da espécie em estudo.

Os métodos mais tradicionais de determinação do sorotipo da cepa viral infectante, como a soroneutralização (SN) e diferentes sistemas de ELISA, também são comumente empregados nas rotavirose. Infecções mistas, bem como a presença de variantes antigênicas, dificultam a clas-

sificação sorológica de muitas cepas de rotavírus grupo A por meio de sistemas de ELISA que utilizam painéis de anticorpos monoclonais. O uso apenas do ELISA para a sorotipagem de cepas de rotavírus grupo A apresenta também limitações em razão da indisponibilidade comercial de anticorpos monoclonais neutralizantes para a identificação de alguns sorotipos G (VP7) e da maioria dos sorotipos P (VP4).

Devido à alta prevalência da infecção na maioria dos rebanhos de animais de produção, não é comum a realização do diagnóstico sorológico. Animais adultos podem apresentar taxas superiores a 90% de soropositividade.

4.4.4 Controle e profilaxia

A profilaxia das rotavirose não se restringe apenas à adoção de medidas de caráter higiênico-sanitário, visto que a infecção se estabelece inclusive em rebanhos de propriedades altamente tecnificadas e com bom manejo sanitário. Medidas gerais de profilaxia da infecção podem incluir: a) isolamento dos animais infectados com o objetivo de reduzir a transmissão do vírus aos animais susceptíveis; b) criação de animais de faixas etárias uniformes; c) desinfecção de instalações; d) rodízio de piquetes de parições em rebanhos bovinos de criação extensiva; e) vazio sanitário.

Nos mamíferos domésticos, os anticorpos rotavírus-específicos presentes no colostro são particularmente importantes na proteção dos animais neonatos. Embora a maior parte dos anticorpos colostrais seja absorvida pelos animais recém-nascidos, altos títulos de anticorpos séricos parecem não ser eficazes na proteção contra a infecção. Porém, as imunoglobulinas presentes na luz intestinal participam efetivamente na proteção contra os rotavírus. Dessa forma, a ingestão de colostro de boa qualidade pode prevenir a incidência da doença nos neonatos ou reduzir a gravidade da diarreia. Com esse propósito, preconiza-se a vacinação das fêmeas gestantes com vacinas inativadas para garantir altos títulos de anticorpos específicos no colostro.

Contudo, também no campo imunoprofilático, as rotavirose representam um desafio para a elaboração de imunógenos capazes de induzir

resposta imunológica plena e duradoura. A variabilidade antigênica e molecular dos rotavírus, gerada pelas características próprias de seu genoma e expressas nos vários grupos sorológicos, sorotipos e mesmo variantes de sorotipos circulantes representa um grande obstáculo para a obtenção de vacinas efetivas. Devido à complexidade e diversidade genômica dos rotavírus, fica evidente que o prévio conhecimento dos genótipos P e G das cepas virais circulantes em uma região, bem como a sua distribuição temporal, é fundamental para o planejamento de qualquer programa de vacinação.

5 Gênero *Orbivirus*

Os orbivírus constituem um dos 11 gêneros da família *Reoviridae*. Os vírus desse gênero infectam uma variedade de vertebrados, incluindo ruminantes domésticos e selvagens, eqüídeos, roedores, morcegos, primatas, marsupiais e aves. Esses vírus infectam e são primariamente transmitidos por artrópodes vetores como mosquitos e carrapatos, mas a infecção nestas espécies não apresenta efeitos deletérios evidentes.

Com base em reatividade sorológica, 19 espécies de orbivírus, abrangendo pelo menos 130 sorotipos, já foram definidas. Ainda assim, existem vários isolados não-classificados. Os so-

rogrupos, número de sorotipos, principais vetores e hospedeiros desses vírus estão listados na Tabela 30.4.

Dentre as espécies de orbivírus importantes na medicina veterinária, incluem-se o vírus da língua azul (*bluetongue virus*, BTV) que possui 24 sorotipos conhecidos; o vírus da doença hemorrágica epizootica dos cervídeos (EHDV), com dez sorotipos; o vírus da peste eqüina (*african horse sickness virus*, AHSV), com nove sorotipos; o vírus da encefalose eqüina (EEV), com sete sorotipos, e o vírus Palyam. Estas três últimas enfermidades são exóticas no Brasil e encontram-se basicamente restritas aos continentes africano e asiático.

5.1 Propriedades gerais

Os vírions maduros medem entre 60 e 85 nm de diâmetro, não apresentam envelope lipídico, e as proteínas que formam a partícula viral estão dispostas em camadas concêntricas que, geralmente, conferem uma simetria icosaédrica. Os vírions apresentam coeficiente de sedimentação de 55 S e densidade de flutuação em CsCl₂ de 1,36 - 1,38 g/cm³. Esses vírions são resistentes a solventes lipídicos, sensíveis a desinfetantes à base de iodoforos e fenóis. São estáveis sob pH entre 6,5 e 8 e quando armazenados a temperatura de 4°C, principalmente na presença de matéria orgânica.

Tabela 30.4. Principais membros do gênero *Orbivirus* associados com doenças em animais.

Sorogrupo	Sorotipos	Hospedeiros	Doença	Distribuição geográfica	Vetor
Peste eqüina	1 a 10	Eqüídeos, zebras, cães	Doença cardiopulmonar, febre	África, Oriente Médio, Ásia e Europa	<i>Culicoides</i>
Língua azul	1 a 24	Ovinos, bovinos, caprinos, cervídeos	Rinite, estomatite, laminite	África, Ásia, Austrália, Américas	<i>Culicoides</i>
Doença epizootica hemorrágica	EHDV (vários sorotipos)	Cervídeos	Similar a língua azul	Américas, Austrália, África	<i>Culicoides</i>
	Ibakari Kawanabe	Bovinos	Doença febril semelhante a língua azul, encefalite	Ásia, Austrália, Japão	<i>Culicoides</i>
Palyam	Kasba	Bovinos	Abortos	África do Sul	<i>Culicoides</i>
	Chuzan	Bovinos	Malformações congênitas	Japão	<i>Culicoides</i>

O congelamento pode reduzir até 90% a infectividade viral, porém a infectividade é preservada quando mantidos a -70°C.

O genoma desses vírus é composto por 10 segmentos de dsRNA, cada um deles codificando uma, duas ou três proteínas (geralmente uma). O padrão de migração desses segmentos pode ser usado para diferenciar sorogrupos dos orbivírus, assim como diferenciá-los de outros gêneros da família *Reoviridae*.

Devido à natureza dos genomas segmentados e, dependendo da compatibilidade genética, os orbivírus podem sofrer ressortimento de seus genes durante infecções mistas. Esses eventos podem envolver vírus de um mesmo sorotipo ou diferentes sorotipos. Uma alta frequência de ressortimentos genômicos entre orbivírus relacionados já foi demonstrada em hospedeiros vertebrados e invertebrados, bem como em cultivos celulares. Aparentemente, a frequência de ressortimento é mais observada nos vetores artrópodes. Esse fenômeno é um dos responsáveis pela diversidade genética da população dos orbivírus na natureza. Múltiplos sorotipos de um mesmo ou de diferentes sorogrupos têm sido identificados no mesmo inseto, indicando que vírus geneticamente distintos podem estar presentes em um único hospedeiro.

Também têm sido reportadas variações genéticas dentro de isolados do mesmo sorotipo ao longo de um mesmo ano em diferentes regiões, indicando que mutações e evolução ocorrem também dentro de cada sorotipo.

Assim, os sorotipos atualmente existentes nos diversos continentes refletem provavelmente uma combinação de mutações, rearranjos e co-evoluções de um *pool* de genes de vírus de várias localidades. Essa evolução ocorre através dos tempos e resulta em uma diversidade genética com conseqüências epidemiológicas e clínico-patológicas ainda pouco conhecidas. Da mesma forma, o impacto dos rearranjos dos segmentos sobre o fenótipo viral, viremia e transmissibilidade, pressão seletiva na resposta imune do hospedeiro, virulência e conseqüências do uso de vacinas vivas multivalentes são ainda pouco conhecidos.

As duas proteínas externas do capsídeo (VP5 e VP2) são as mais variáveis dentro dos so-

rotipos e entre as diferentes espécies do gênero, enquanto as proteínas não-estruturais NS1 e NS2 são altamente conservadas. Estudos baseados na seqüência de aminoácidos da proteína estrutural VP3, que é altamente conservada, têm sido utilizados para agrupar cepas isoladas de diferentes regiões, como América, África do Sul e Austrália, em sorotipos e sorogrupos. Por outro lado, estudos baseados na seqüência da VP5 fornecem informações sobre o sorotipo viral. De fato, uma comparação entre as seqüências das proteínas do BTV, EHDV e AHSV indicou que a VP3 é a proteína mais conservada e a VP2 a mais variável.

5.2 O vírion, o genoma e as proteínas virais

Grande parte dos conhecimentos sobre a estrutura das partículas víricas, biologia molecular e replicação dos orbivírus foi obtida a partir de estudos do protótipo do gênero, o BTV. O genoma do BTV consiste de 10 segmentos de dsRNA, divididos em três segmentos grandes (L1 a L3), três médios (M4 a M6) e quatro pequenos (S7 a S10). O conjunto de segmentos genômicos codifica sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e três proteínas não-estruturais (NS1 a NS3). As duas fitas de RNA que compõem cada segmento genômico são exatamente complementares, embora a extremidade 5' da fita codificante (polaridade positiva) de cada duplex possua a estrutura *cap*, enquanto a cadeia complementar não possui esta modificação em sua extremidade. A seqüência completa de nucleotídeos de todos os segmentos de vários sorotipos do BTV e de alguns representantes dos grupos da EHDV e AHSV já foi estabelecida. As características de cada segmento, a(s) proteína(s) codificada(s), sua localização e prováveis funções estão apresentadas na Tabela 30.5.

Os vírions do BTV medem entre 65 a 75 nm de diâmetro, não apresentam envelope lipídico, e as proteínas que formam a partícula viral estão dispostas em camadas concêntricas que conferem a ela uma simetria icosaédrica (Figura 30.7). A camada interna ou núcleo (54-58 nm de diâmetro) contém cinco proteínas (VP1, VP3, VP4, VP6 e VP7). Dentre estas, a VP7 (antígeno determinante do sorogrupo) e a VP3 são as mais abundantes. A

Tabela 30.5. Características dos segmentos genômicos e das proteínas codificadas pelo genoma dos orbivírus.

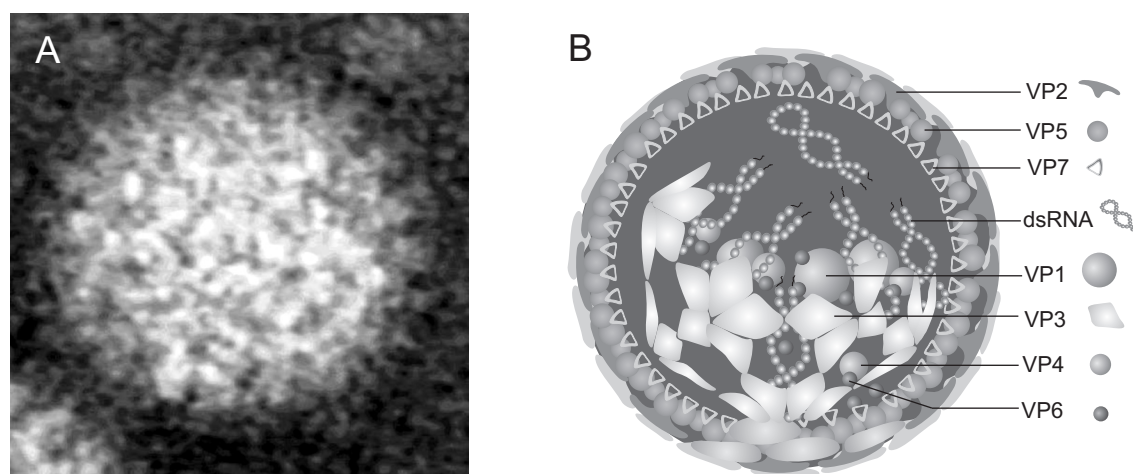
Segmento do genoma	Nº de bases	Proteína codificada	Massa (Da)	Localização na partícula viral	Principais funções
L1	3.954	VP1	149.588	Núcleo interno	RNA polimerase
L2	2.926	VP2	111.112	Capsídeo externo	Ligação aos receptores celulares e penetração nas células de mamíferos; hemaglutinina; determinação do sorotipo, principais epítopos neutralizantes.
L3	2.772	VP3	103.344	Subnúcleo	Formação de estrutura para deposição dos trímeros de Vp7.
M4	2.011	VP4	76.433	Núcleo interno	Função enzimática de guanililtransferase e metiltransferase.
M5	1.639	VP5	59.163	Capsídeo externo	Penetração viral.
M6	1.770	NS1	64.445	Não-estrutural	Formação dos túbulos.
S7	1.156	VP7	38.548	Subnúcleo	Determinação do sorogrupo, penetração em células de insetos.
S8	1.124	NS2	40.999	Não-estrutural	Formação de corpúsculos de inclusão, ligação a RNA de fita simples.
S9	1.046	VP6	35.750	Núcleo interno	Ligação à ssRNA, dsRNA, helicase e ATPase.
S10	822	NS3	25.572	Não-estrutural	Auxílio no egresso das partículas víricas.
		NS3A	24.020		

VP3 forma uma estrutura central ou subnúcleo, no qual 260 trímeros da VP7 estão ancorados. Por isso exerce uma importante função na integridade estrutural do núcleo viral. A sequência de nucleotídeos que codifica a VP3 é altamente conservada entre os diferentes sorotipos do vírus e também é muito semelhante a VP3 do EHDV e ASFV. A VP7 é a proteína mais abundante que compõe o núcleo e contém os principais determinantes antigênicos específicos de grupo. Apesar de fazer parte do núcleo, sabe-se que esta proteína está exposta em algumas regiões da superfície viral e é capaz de estimular a produção de anticorpos.

Localizadas no interior do subnúcleo, as proteínas VP1, VP4 e VP6 estão presentes em pequenas quantidades e parecem não desempenhar um papel importante na estrutura do núcleo. A VP1 é a proteína com maior massa do BTV e, com base em sua massa, localização, concentração molar

no núcleo e sequência de aminoácidos, acredita-se que seja a RNA polimerase viral. Essa proteína seria a responsável pela transcrição e replicação do genoma durante a replicação viral nas células hospedeiras.

O núcleo icosaédrico do BTV é circundado pela camada externa ou capsídeo, que é composto pelas proteínas VP2 e VP5. Estas proteínas são as menos conservadas entre os diferentes sorotipos do vírus. A VP2 é o principal determinante do sorotipo e é responsável pelo estímulo para a produção de anticorpos neutralizantes. Além disso, apresenta atividade de hemaglutinação e hemadsorção. A segunda proteína do capsídeo externo é a VP5, que possui 526 aminoácidos. Esta proteína é mais variável do que as outras proteínas do núcleo, mas é mais conservada do que a VP2. A VP5 possui uma função importante na penetração do vírus na membrana do endossomo, sendo responsável pela liberação do núcleo viral no ci-



Fonte: A) Dr Peter Mertens, www.iah.bbsrc.ac.uk; B) Adaptado de Roy (2001).

Figura 30.7. Partículas víricas dos orbivírus. A) Fotografia de microscopia eletrônica de um vírion; B) Ilustração esquemática da estrutura de uma partícula vírica indicando os elementos constituintes.

toplasma celular. A sua conformação estrutural indica que é capaz de induzir a permeabilização e desestabilização de membranas.

Três proteínas não-estruturais (NS1, NS2 e NS3) são produzidas durante a replicação do BTV. A NS1 e NS2 são sintetizadas abundantemente, enquanto NS3 é de difícil detecção. A sequência dessas proteínas é altamente conservada entre os sorotipos, o que indica a sua importância para a replicação desses vírus. A síntese da NS1 e NS2 coincide, respectivamente, com o aparecimento de duas estruturas vírus-específicas: os túbulos e os corpúsculos de inclusão. Presume-se que essas estruturas estejam envolvidas na replicação e no processo de transporte das partículas virais para a membrana celular ou na prevenção da mitose em células infectadas. A NS3 é a proteína menos abundante do BTV e a sua função ainda não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que é essencial para o egresso das partículas víricas da célula.

5.3 Replicação

A adsorção dos vírions do BTV às células hospedeiras parece envolver uma interação rápida e específica de algumas regiões da VP2 com componentes da membrana celular, sendo esta

proteína a principal responsável pela penetração do vírus nas células de mamíferos. Acredita-se que a VP7, localizada no *core*, esteja envolvida em um mecanismo equivalente nas células dos insetos vetores *Culicoides*. A natureza dos receptores celulares que mediam este evento ainda está sendo esclarecida, porém sabe-se que a VP2 possui a característica de se ligar a uma sialoglicoproteína presente em eritrócitos de várias espécies animais.

Após a ligação aos receptores por meio da VP2, os vírions são internalizados por endocitose. Poucos minutos após, os vírions podem ser encontrados no interior de vesículas nas proximidades do núcleo. Aproximadamente uma hora pós-infecção, as partículas perdem as proteínas VP2 e VP5 do capsídeo, provavelmente pela ação do baixo pH e pela concentração de cátions no interior dos endossomos. Este mecanismo é essencial para que a transcriptase viral (RNA polimerase) se torne ativa, o que ocorre pelo acesso de nucleotídeos trifosfato ao genoma viral através de canais localizados nas camadas que delimitam o núcleo viral.

No citoplasma, as partículas virais semi-desintegradas se ligam a fibras do citoesqueleto e, após o início da transcrição do genoma viral, a síntese das proteínas da célula hospedeira é rapi-

damente reprimida. O primeiro polipeptídeo viral é detectado duas a quatro horas pós-infecção, e a síntese protéica viral atinge o pico entre nove e 11 horas após, diminuindo progressivamente até a morte celular.

A proteína VP6 possui função de helicase e desenrola os componentes do duplex de RNA genômico, enquanto a VP1 inicia a síntese de moléculas de RNA de sentido positivo, para serem utilizadas como mRNA para a síntese protéica.

Uma vez sintetizadas, essas moléculas são modificadas pela atividade enzimática da VP4, sendo metiladas na extremidade 5'. Os mRNA, assim sintetizados, são exportados dos capsídeos semi-integros para o citoplasma, para o início da tradução. A fita de RNA de polaridade negativa é sintetizada também pela ação da VP1, iniciando a partir da extremidade 3' das fitas positivas. Em geral, os segmentos genômicos menores são transcritos com maior frequência, porém o fragmento que codifica a proteína NS1 é o mais abundantemente transcrito.

A condensação dos RNAs recém-produzidos pela transcrição e as proteínas recém-produzidas pela tradução formam os corpúsculos de inclusão, onde os vírions são montados gradativamente, desde núcleo até partícula viral completa, e, subsequentemente, liberados para o citoplasma. A VP2 e a VP5 são adicionadas aos vírions na periferia dos corpúsculos.

Os corpúsculos de inclusão podem ser granulares ou fibrilares, são encontrados dispersos pela célula e correspondem aos sítios de morfogênese das partículas virais. Esses corpúsculos são compostos por ssRNA, dsRNA, núcleos e subnúcleos virais, algumas proteínas estruturais (VP3, VP7 e VP5) e, principalmente, a NS2. Esta proteína pode ligar-se ao RNA viral, facilitando, assim, o seu encapsidamento no interior dos núcleos virais. Proteínas estruturais e partículas virais completas são observadas em maior concentração na periferia dos corpúsculos.

A NS1 é produzida em grandes quantidades, formando os túbulos que estão presentes em grande abundância, predominantemente ao redor ou nas proximidades do núcleo da célula hospedeira. Essas estruturas são características da infecção por orbivírus e apresentam diferen-

ças em relação a sua espessura e extensão, variando para cada espécie viral, o que sugere que possuem uma função específica para cada grupo viral. Os corpúsculos, os túbulos e as partículas virais recém-formadas são associadas com redes de filamentos intermediários no citoesqueleto celular.

No processo de morfogênese das partículas, ocorre inicialmente a formação do subnúcleo, que é composto pela VP3, VP4, VP1 e VP6. Em seguida, são montados e adicionados os trímeros de VP7, formando o núcleo viral. Acredita-se que a NS2, com a sua capacidade de ligação ao RNA, facilita o "empacotamento" dos segmentos genômicos no núcleo viral. A seguir, as proteínas VP2 e VP5 se associam através da interação com a VP7.

Vários estudos da morfogênese do BTV têm sido conduzidos, utilizando a expressão de proteínas individuais no sistema de baculovírus. Nesses estudos, observou-se que as proteínas estruturais possuem a capacidade de se associarem entre si, na ausência do genoma, formando partículas chamadas de CLP (*core like particles*) ou VLP (*virus like particles*), dependendo da combinação das proteínas produzidas.

Após a formação do capsídeo pela adição da VP2 e VP5 ao núcleo viral, as partículas virais estão prontas para o seu egresso das células infectadas. Nas fases iniciais da infecção, os vírions podem ser liberados por brotamento através da membrana plasmática, onde adquirem um envelope temporário. Quando já há desestruturação da membrana celular, grupos de partículas virais se movem através de membrana plasmática rompida e são, assim, liberados. A proteína não-estrutural NS3 tem sido identificada nesses sítios, sugerindo um papel importante, provavelmente mediando a liberação das partículas por exocitose.

5.4 Patogenia

Os orbivírus são transmitidos para os hospedeiros vertebrados por insetos hematófagos. Após a replicação primária nos linfonodos regionais, os vírions se disseminam para o baço, timo e outros linfonodos associados às células

sangüíneas. O BTV se liga a glicoforinas na superfície dos eritrócitos de bovinos e ovinos, onde persiste em invaginações da membrana. Nesses locais, os vírions permanecem protegidos dos anticorpos circulantes por longo período, resultando em viremia prolongada. Essa viremia de longa duração proporciona uma contínua oportunidade para a transmissão do agente.

A maioria dos orbivírus são neurovirulentos e alguns são neuroinvasivos quando inoculados em camundongos ou *hamsters*, e os fetos são particularmente susceptíveis a infecção.

Uma característica marcante da patogenia da infecção por esses vírus é a sua capacidade de replicar e destruir células endoteliais em diferentes órgãos. A lise dessas células leva à injúria vascular, resultando em lesão dos capilares, hemorragias e coagulação intravascular disseminada. Clinicamente, observa-se edema generalizado, hidrotórax, hidropericárdio, hemorragias generalizadas, hipotensão e choque.

A capacidade de atravessar a placenta e infectar os fetos é outra propriedade importante dos orbivírus. A infecção de ovelhas e vacas, com o BTV, e de bovinos, com o vírus de Ibaraki ou o vírus Kasba do grupo Palyam, pode resultar em abortos e no nascimento de produtos com anormalidades, incluindo hidrocefalia, artrogripose, prognatismo, cegueira e surdez.

5.5 Vírus da língua azul

Dentre os membros do gênero orbivírus, o vírus da língua azul (BTV) é o que possui maior relevância em medicina veterinária e será abordado com detalhes.

A língua azul (BT) é uma enfermidade infecciosa, não-contagiosa, associada com a infecção pelo BTV, transmitida por insetos vetores e caracterizada por inflamação das mucosas, hemorragia e edema generalizados. A enfermidade tem sido também denominada febre catarral do carneiro. Os isolados do BTV podem ser agrupados em 24 sorotipos, de acordo com a sua reatividade sorológica. Variações de patogenicidade e virulência têm sido observadas entre isolados de campo, assim como diferentes padrões de tropismo tecidual e fetal.

O maior impacto da doença causada pelo BTV é observado na indústria ovina, já que é nesta espécie que as manifestações clínicas da doença ocorrem com maior frequência e severidade. As perdas por mortalidade podem chegar a 40%, e perdas indiretas por queda de produção no período de convalescença são especialmente importantes. Para países que produzem lã de alta qualidade, a “quebra da lã” pode ocorrer como consequência da doença, causando sérios prejuízos. Nos bovinos, a doença clínica é rara e, apesar de perdas diretas ocorrerem, principalmente em casos de epidemias, as maiores perdas são causadas pelas restrições de mercado. De fato, as restrições ao comércio de animais e subprodutos provavelmente são responsáveis pelas maiores perdas econômicas associadas com a infecção pelo BTV. Por muitos anos, a infecção pelo BTV foi considerada uma das principais barreiras para a exportação de ruminantes dos EUA para outros países, sobretudo para a Austrália, Nova Zelândia e Comunidade Européia.

5.5.1 Epidemiologia

O BTV é capaz de infectar naturalmente uma variedade de ruminantes domésticos e selvagens, incluindo ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos, camelos, cervídeos e outros herbívoros, como os elefantes. A doença clínica é mais comum nos ovinos e cervídeos. Embora a infecção nos bovinos seja de grande importância epidemiológica, a infecção nesta espécie é geralmente subclínica. Em 1994, nos Estados Unidos, foi demonstrada uma associação entre a administração de vacinas contaminadas com o BTV e morte fulminante em cães com problemas cardíacos e respiratórios. A importância desses achados é desconhecida.

O vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides*, que possuem grande variação de hábitos alimentares, preferência por hospedeiros e competência na transmissão da infecção. No Brasil, os mosquitos *Culicoides* sp. são denominados “maruim”, “mosquitos-pólvora” ou “mosquitos-do-mangue”. Apesar de existirem poucos estudos sobre esses vetores no País, várias espécies competentes na transmissão da doença, como o *Culicoides insignis*, já foram descritas.

Os mosquitos adquirem o vírus quando ingerem sangue de um hospedeiro virêmico. Apenas as fêmeas são hematófagas e requerem pelo menos um repasto sanguíneo para a conclusão de um ciclo ovariano. Por isso o pico de atividade desses insetos está relacionado com o seu ciclo reprodutivo. Estações quentes e úmidas favorecem o aparecimento dos *Culicoides* e, conseqüentemente, a maior transmissão do vírus. A população desses insetos tende a diminuir no outono e inverno, quando a temperatura é mais baixa.

Após a ingestão e adsorção na parede do intestino médio do mosquito, o vírus se multiplica em tecidos intestinais e em outros tecidos do inseto, incluindo as glândulas salivares. Assim, pode ser transmitido a um novo hospedeiro ao se alimentar novamente.

A viremia que ocorre nos hospedeiros é essencial para a transmissão do vírus, uma vez que, nessa fase, o vírus encontra-se associado às células sanguíneas (principalmente monócitos, linfócitos e eritrócitos). Nos ovinos e caprinos, a viremia dura em média 50 e 28-41 dias, respectivamente. Nos bovinos, a viremia pode persistir por mais de 100 dias, sendo estes animais considerados de grande importância epidemiológica por servirem como reservatórios do vírus por períodos prolongados. Durante esse período, o vírus circula intimamente associado com a membrana dos eritrócitos, ficando protegido dos anticorpos neutralizantes. Várias espécies de *Culicoides* competentes na transmissão do BTV se alimentam preferencialmente nos bovinos, mesmo quando ovinos e caprinos estão presentes.

A infecção pelo BTV está distribuída nas áreas tropicais e subtropicais em todos os continentes, entre as latitudes 40°N e 35°S, onde está concentrado aproximadamente 70,7% do rebanho ovino mundial. Essa área inclui as Américas, África, parte da Europa, Ásia e Oriente Médio. Muitos países localizados em áreas tropicais, como a Ásia, Caribe e América do Sul, apresentam evidências sorológicas da presença do BTV em ovinos e outros ruminantes, porém sem relatos da ocorrência de doença.

A distribuição geográfica da BT pode ser dividida em três áreas epidemiológicas, com o objetivo de facilitar a análise da epidemiologia da doença:

a) áreas endêmicas: onde a infecção é comum, mas a ocorrência da doença clínica é rara devido à presença de grande número de animais soropositivos. Nessas áreas, o vírus pode ser isolado, com frequência, de insetos vetores ou de animais virêmicos. A doença pode ocorrer após a introdução de animais virêmicos infectados com sorotipos exóticos para a área ou quando animais susceptíveis, oriundos de zonas livres da doença, são introduzidos nessas áreas;

b) áreas epiendêmicas: onde o número de animais soropositivos varia e a ocorrência da doença é geralmente localizada em áreas específicas. Casos de doença podem ocorrer em formas de surtos esporádicos, dependendo principalmente de variações climáticas, como temperatura, umidade do ar, velocidade e direção dos ventos;

c) áreas livres: onde não há animais soropositivos, geralmente pela impossibilidade de sobrevivência dos insetos vetores.

Vários fatores podem alterar a distribuição do vírus dentro dessas áreas, como alterações climáticas em regiões limítrofes, movimento de animais, mudanças nas características da estação chuvosa e, principalmente, movimento dos ventos, que podem trazer os vetores *Culicoides* de regiões distantes. O movimento dos hospedeiros para áreas endemicamente infectadas em busca de alimentos ou de climas mais amenos também pode levar ao aparecimento de surtos localizados. Assim, essas zonas são dinâmicas e representam o resultado da interação entre o vírus, o meio ambiente e os hospedeiros.

No passado, o BTV já havia sido esporadicamente detectado em alguns países da costa do mar Mediterrâneo, mas, nas últimas décadas, parecia estar ausente do continente. No entanto, em 2006, foi reintroduzido em vários países europeus (Holanda, Bélgica e Alemanha), provavelmente a partir da África, onde permanece endêmico. A reintrodução do vírus na Europa causou uma grande repercussão, pelas possíveis conseqüências sanitárias e comerciais e também pelo receio de a infecção se tornar endêmica em algumas regiões com condições climáticas propícias para a sobrevivência dos vetores.

Os inquéritos sorológicos, realizados no território brasileiro, em bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos por meio da técnica de imunodifusão

em gel de ágar (IDGA), indicam que a infecção está amplamente distribuída em todas as regiões. Pelos dados sorológicos obtidos associados com a falta de relatos clínicos, acredita-se o BTV perpetue-se de forma inaparente nos rebanhos brasileiros. Os casos clínicos que ocorrem parecem ser brandos ou de menor importância do ponto de vista econômico e, muitas vezes, passam despercebidos. As possíveis explicações para este fato são: baixa virulência das cepas circulantes no país, maior resistência de algumas raças contra a infecção ou a característica endêmica que a infecção assume na maior parte do país, onde as condições de temperatura e umidade favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores.

O estado do Rio Grande do Sul apresenta as menores taxas de prevalência, provavelmente devido ao clima, que não favorece a sobrevivência dos vetores, porém se mostra como área de risco, com um grande número de animais susceptíveis. Nos estados da região Nordeste, onde se encontra o principal efetivo dos rebanhos ovinos e caprinos, assim como os estados da região Sudeste, que estão entre os líderes na produção de carne e leite no Brasil, observa-se a presença dos fatores necessários para a ocorrência da doença: vírus circulando, vetores e animais susceptíveis. Em Minas Gerais, estudos recentes mostraram uma soroprevalência de 45 e 54% em caprinos e ovinos, respectivamente.

Até o presente, apenas dois sorotipos do BTV foram identificados inequivocamente no Brasil. O sorotipo 4 foi isolado, em 1980, nos EUA, de animais que haviam sido exportados para aquele país. O sorotipo 12 foi identificado em 2001, no Paraná, onde caprinos, ovinos e bovinos foram acometidos. No entanto, investigações realizadas em laboratórios internacionais de referência, utilizando a técnica de SN, indicam que outros sorotipos podem também estar presentes no Brasil.

O risco de se introduzir o BTV pela importação de animais é considerado muito maior do que a introdução por sêmen ou embriões contaminados. Embora a transmissão venérea, por meio de sêmen contaminado e transmissão congênita do vírus possam ocorrer, a restrição geográfica da doença indica que esses mecanismos não são importantes para a perpetuação da infecção a longo

prazo, ou seja, a principal forma de disseminação do vírus é por meio de insetos vetores.

O risco de transmissão por transferência de embriões é muito baixo, desde que as recomendações técnicas sejam seguidas. Da mesma forma, existem poucos relatos na literatura descrevendo o isolamento do BTV a partir de outras secreções que não o sêmen. Portanto, não se sabe se o vírus estaria presente em outras secreções ou se poderia ser transmitido por via iatrogênica. De qualquer forma, esses possíveis mecanismos de transmissão provavelmente possuam importância epidemiológica limitada.

5.5.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A replicação inicial do vírus ocorre no sítio da picada do inseto vetor, sobretudo, nas células endoteliais do sistema vascular e em células do sistema linforreticular. A replicação primária é seguida por viremia associada às células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e disseminação do vírus para outros linfonodos, baço, medula óssea e outros tecidos. Nesses tecidos, o vírus se replica no sistema microvascular, resultando nas alterações patológicas características da doença. A maior concentração de vírus se encontra nos endotélios da microvascularização do epitélio bucal. Uma grande variedade de órgãos pode ser afetada, incluindo pulmões, baço, coração, rim e bexiga.

Acredita-se que o vírus interaja de forma distinta com os receptores das células endoteliais das diferentes espécies animais, resultando em diferenças marcantes na patologia vascular. Isso poderia explicar as manifestações clínicas distintas observadas entre as espécies de ruminantes afetadas. Algumas hipóteses propõem que as manifestações clínicas nos bovinos podem estar associadas com uma reação de hipersensibilidade retardada, mediada por imunoglobulinas da classe E (IgE), devida as várias e constantes reinfeções pelo vírus.

Em ovinos, o período de incubação varia entre cinco e dez dias. Os sinais clínicos iniciam-se por uma elevação da temperatura corporal, que coincide com o aumento da frequência res-

piratória. As manifestações clínicas podem estar ausentes ou se manifestarem de forma aguda. Em áreas endêmicas, a doença é rara, apresentando-se geralmente em animais vindos de áreas livres. Como regra, o primeiro sinal é o aumento da temperatura corporal de 41 a 42°C, seis a sete dias pós-infecção. A hipertermia persiste, em média, seis a sete dias, mas este período pode ser tão curto quanto dois dias ou tão longo quanto 11 dias. A ocorrência de um segundo pico febril nos dias 10-11 pós-infecção pode ser observada em alguns casos.

Os primeiros sinais observados são: hiperemia no focinho, lábios e mucosa oral, que torna-se evidente entre dois a três dias após a febre. A hiperemia pode se estender para a pele, levando à “quebra de lã”. Edema generalizado na face e mandíbula desenvolve-se 10-12 dias após a infecção. Descarga nasal serosa e mucopurulenta pode ocorrer. A presença de exsudado seroso ou serossanguinolento, evoluindo a mucopurulento, de forma a bloquear a abertura das narinas e forçar a respiração pela boca, pode ser observada. A língua pode estar edemaciada e estendida para fora da boca, mas raramente se torna cianótica, apesar deste sinal ter sido o responsável pela denominação da doença. Ulcerações na língua e em mucosas podem propiciar infecções secundárias e necrose, principalmente na região superior do esôfago e faringe, causando vômito e aspiração do conteúdo ruminal, levando à pneumonia debilitante.

A inflamação da banda coronária imediatamente acima do casco, geralmente resultando em laminite, é outro achado comum, principalmente nas fases finais de infecção. Prostração e dificuldade de locomoção são geralmente observadas em consequência das lesões musculares e nos cascos. Fraqueza muscular e, em casos extremos, torcicolo irreversível e morte, podem ocorrer.

Ovelhas prenhes podem abortar em qualquer fase da gestação. A infecção dos fetos com 40 a 80 dias de idade geralmente apresenta, como consequência, o nascimento de cordeiros com hidrocefalia e outras alterações no cérebro, displasia da retina e outras alterações teratogênicas.

A infecção pelo BTV em bovinos é muito comum, mas a ocorrência de manifestações clínicas é considerada rara nessa espécie. A severidade da

infecção e da doença pode ser influenciada pelo sorotipo, dose infectante, fisiologia do hospedeiro, raça e outros fatores externos. Os surtos são esporádicos, e a morbidade é variável, situando-se geralmente em torno de 5%. Provavelmente menos de 1% dos bovinos infectados apresentem sinais clínicos em decorrência da infecção. Esses sinais são caracterizados por febre transitória, seguida de hiperemia e lesões ulcerativas na língua, palato, gengiva, mucosa oral e lábios. O focinho apresenta uma aparência ressecada, com a pele quebradiça. Com o progresso da doença, os animais podem apresentar claudicação devido a inflamação da região da coroa do casco. Úlceras nos tetos podem se desenvolver, com uma subsequente redução na produção de leite. Em casos crônicos, a patologia é mais pronunciada na pele, na qual se observam edema e infiltração eosinofílica na derme.

A infecção de vacas prenhes na primeira metade da gestação (até 150 dias) pode resultar em morte embrionária ou fetal ou no nascimento de bezerros com malformações neurológicas, como hidrocefalia e cegueira. Fetos infectados em fases posteriores nascem normais ou podem apresentar viremia prolongada. No entanto, ainda não foi comprovada a ocorrência de animais imunotolerantes ao vírus. Existem evidências de que algumas amostras do BTV ou mesmo alguns sorotipos possuem predileção pelo útero grávido e, conseqüentemente, produzem infecção do concepto.

A infecção de caprinos é geralmente branda ou inaparente, manifestando-se apenas por febre ocasional, viremia em níveis baixos e curta duração, leucopenia e hiperemia leve da conjuntiva e mucosa nasal. Em alguns ruminantes silvestres – sobretudo cervídeos –, o BTV pode produzir manifestações clínicas semelhantes às observadas na infecção aguda em ovinos.

Os achados patológicos da enfermidade causada pelo BTV estão relacionados com as lesões no endotélio vascular, que resultam na sua fragilização e em alterações na permeabilidade vascular. Essas alterações resultam em edema, congestão, hemorragias, inflamação e necrose.

Em ovinos, a face e as orelhas se apresentam edematosas, e as narinas podem conter exsudato. As bandas coronárias freqüentemente se encon-

tram hiperêmicas. Petéquias, úlceras e erosões são comuns na cavidade oral. As mucosas nasal e oral podem estar congestionadas, necrosadas e cianóticas. Hiperemia e erosões podem ser encontradas no retículo e omaso. Petéquias, equimoses e focos necróticos podem ser observados no coração. Hemorragia na base da artéria pulmonar é um achado particular da doença em ovinos. Hiperemia, hemorragia, edema em vários órgãos, hemorragias focais e necrose nos músculos esqueléticos podem também ser observados.

Nos cervídeos, as lesões mais evidentes são petéquias e equimoses disseminadas por vários órgãos e tecidos. Animais com úlceras necróticas na cavidade oral e lesões nos cascos podem ser encontrados em casos em que o curso da doença é mais prolongado.

O exame microscópico das lesões das mucosas demonstra infiltração de células mononucleares, degeneração e necrose das células epiteliais. Os músculos afetados apresentam edema, hemorragia, degeneração hialina e necrose. Infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos estão presentes em casos agudos.

5.5.3 Diagnóstico

Deve-se suspeitar de língua azul quando os sinais clínicos característicos da doença forem observados em ovinos e bovinos, principalmente nas estações de maior atividade dos vetores ou quando animais provenientes de outras regiões são introduzidos em áreas endêmicas.

Para o diagnóstico laboratorial, amostras de sangue total e de soro devem ser coletadas de vários animais do rebanho. Baço, medula, coração e linfonodos mesentéricos são os tecidos de escolha a serem coletados em animais submetidos à necropsia. Sangue, soro, baço e tecido nervoso devem ser coletados de cordeiros ou bezerros com problemas congênitos. O material deve ser enviado refrigerado, o mais rápido possível, para o laboratório.

O diagnóstico sorológico da infecção pelo BTV é baseado principalmente nas técnicas de IDGA e ELISA, que identificam a exposição dos animais a vírus do sorogrupo BTV. Esses testes

têm sido extensivamente utilizados na vigilância epidemiológica e para emissão de certificados de trânsito, cujos rebanhos são destinados à exportação.

Para a detecção do vírus em amostras de sangue e tecidos, o teste *in vitro* mais sensível é a inoculação intravenosa em ovos embrionados, seguida do cultivo em células BHK. A identificação do grupo BTV é geralmente realizada pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) e a tipificação sorológica por meio da técnica de SN, utilizando-se uma bateria de soros dos 24 sorotipos existentes. O isolamento do vírus em cultivo celular, a partir de amostras clínicas, é particularmente difícil, o que dificulta sobremaneira o diagnóstico da infecção. Métodos alternativos, como a RT-PCR, têm sido utilizados para detectar a presença do vírus ou do ácido nucléico viral em amostras clínicas (sangue) e em vetores.

As principais enfermidades consideradas no diagnóstico diferencial são o ectima contagioso, febre aftosa, fotossensibilização, diarreia viral bovina/doença das mucosas, rinotraqueíte infecciosa bovina, estomatite vesicular, febre catarral maligna e enfermidade hemorrágica epizootica dos cervos.

5.5.4 Controle e profilaxia

Em áreas livres, o controle da infecção pelo BTV deve ser focado principalmente no controle do movimento de animais, em regras rígidas de importação e quarentena, geralmente acompanhadas de dois a três testes sorológicos.

Uma vez que a infecção se instale em região livre, o diagnóstico rápido, associado ao sacrifício dos animais, desinfecção rigorosa e controle de vetores são as medidas a serem adotadas. Porém, como a infecção pelo BTV pode ocorrer sem evidências clínicas, sobretudo em bovinos, a infecção pode se disseminar despercebida. Uma vez estabelecida de forma endêmica, a possibilidade de erradicação da infecção é praticamente nula. Assim, as medidas a serem adotadas objetivam minimizar os prejuízos causados pela doença clínica. Nesses casos, o controle pode ser realizado de duas maneiras: interrompendo o ciclo

de transmissão, por meio do controle de vetores; ou reduzindo o número de hospedeiros susceptíveis, pela vacinação.

A separação de ovinos e bovinos pode reduzir a possibilidade dos vetores disseminarem a infecção entre essas espécies. Abrigar os ovinos em áreas protegidas de mosquitos durante a noite, período de maior atividade dos vetores ou para algumas espécies de *Culicoides*, e manejar as ovelhas em áreas de altitude elevada são outras medidas que podem ser adotadas.

A redução na população dos vetores pode ser obtida com uso de inseticidas, que podem ser aplicados diretamente nos animais de forma local ou sistêmica, ou na fase aquática do ciclo dos vetores, visando à destruição das larvas. Embora o uso de pesticidas possa ser efetivo em áreas restritas, a tentativa de controlar *Culicoides* sp. desta maneira não se mostra prática para uso rotineiro, podendo resultar em problemas ambientais, além de ser muito dispendiosa e economicamente inviável. Além disso, depende dos conhecimentos do ciclo biológico, população e dinâmica dos mosquitos da região e aplicação em época certa e com condições climáticas adequadas.

O uso da vacinação nas áreas onde a BT se constitui em problema sanitário importante é a medida mais freqüentemente adotada. Embora a infecção de bovinos seja comum e curse com níveis altos de viremia, em todos os países onde as vacinas são utilizadas, apenas os ovinos têm sido vacinados. As vacinas comercialmente disponíveis são atenuadas e geralmente polivalentes, contendo os sorotipos prevalentes em cada área. A vacinação é adotada rotineiramente em países como a África do Sul, Israel e alguns estados dos EUA, onde a doença causa prejuízos para criadores de ovinos. No Brasil, não existem vacinas disponíveis, pois além da incerteza quanto a distribuição e o impacto econômico da infecção, os sorotipos prevalentes no país não são conhecidos.

5.6 Vírus da doença hemorrágica epizootica dos cervídeos

A doença hemorrágica epizootica dos cervídeos (EHD) é uma doença viral aguda, freqüentemente fatal, que afeta alguns ruminantes

silvestres, principalmente os cervídeos. A doença é caracterizada pela ocorrência de alterações hemorrágicas em vários órgãos e sistemas. A doença é causada pelo EHDV, um membro do gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*. Já foram identificados nove sorotipos deste vírus (sorotipos 1-9) e, ainda, o vírus Ibaraki (IV), que é classificado como um vírus distinto pertencente ao grupo do EHDV. Alguns autores acreditam que o IV e o EHDV sorotipo 2 australiano pertençam ao mesmo sorotipo.

Apesar de não ser uma doença de importância econômica, a EHD apresenta um importante significado pela alta mortalidade que causa nos cervídeos, podendo reduzir drasticamente a população desses animais em determinadas áreas. A doença de Ibaraki possui importância econômica restrita às áreas de sua ocorrência, pois, além de problemas reprodutivos, pode levar à mortalidade de até 10% dos bovinos acometidos.

5.6.1 Epidemiologia

O EHDV pode infectar uma grande variedade de ruminantes silvestres e domésticos, mas os sinais clínicos são observados principalmente em cervídeos. Nos bovinos, a infecção raramente é acompanhada de sinais clínicos. Já a doença de Ibaraki freqüentemente afeta essa espécie. Os ovinos podem ser infectados experimentalmente, mas raramente desenvolvem sinais clínicos; e os caprinos parecem não ser susceptíveis à infecção.

A infecção pelo EHDV está presente na Austrália, Ásia e países africanos. Na América do Norte, a infecção é considerada, junto com a língua azul, a doença mais importante dos cervídeos. Animais soropositivos para o vírus já foram identificados também na América do Sul. A doença de Ibaraki está restrita ao Japão, Coreia e Tailândia, apesar de bovinos soropositivos terem sido identificados também na Austrália e Índia.

No Brasil, poucos estudos têm sido feitos em relação ao EHDV. Apesar de o vírus não ter sido isolado e tipificado, existem evidências sorológicas da sua ocorrência em cervídeos de vida livre nos estados de São Paulo e Mato Grosso. Através de testes sorológicos, realizados em 81 cervídeos

capturados, detectou-se 88% positivos o BTV, 74% positivos para o EHDV e 60% positivos para os dois vírus, indicando a circulação desses vírus no País.

Os vírus do sorogrupo do EHDV são transmitidos por mosquitos do gênero *Culicoides*, que atuam como vetores biológicos. Nos Estados Unidos, onde a doença ocorre frequentemente em cervídeos, o principal vetor é o *C. variipennis*. Surtos das doenças causadas pelo EHDV são descritos principalmente no final do verão e início do outono, épocas da maior população dos vetores. Cervídeos infectados podem permanecer virêmicos por até dois meses, atuando nesse período como reservatórios e fontes de infecção.

5.6.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

O período de incubação da EHD é de cinco a dez dias. Nos cervídeos, os sinais clínicos são semelhantes aos da BT, mas três formas clínicas da doença podem ser observadas:

a) doença hiperaguda: caracterizada por febre alta, anorexia, fraqueza, aumento da frequência respiratória e edema acentuado na cabeça, pescoço e língua. Nesta forma da doença, os animais geralmente morrem em 8 a 36 horas e alguns são encontrados mortos sem a observação prévia de sinais clínicos;

b) forma aguda: os sinais mencionados são acompanhados por extensiva hemorragia em vários tecidos, incluindo a pele, coração e trato gastrointestinal. Geralmente observa-se salivação excessiva e descarga nasal, que pode ser sanguinolenta. Erosões na língua, gengiva, palato, rúmen e omaso podem ser observadas. As formas hiperaguda e aguda apresentam altas taxas de mortalidade;

c) forma crônica: o animal fica doente por várias semanas, mas se recupera gradualmente, quando podem ser observados anéis nos cascos, causados pela interrupção do seu crescimento. Nesta forma da doença, os animais podem também apresentar úlceras e erosões no rúmen.

Em ovinos, geralmente não são observados sinais clínicos relevantes.

A EHD é raramente observada nos bovinos, porém o sorotipo Ibaraki tem sido associado com

surtos esporádicos de uma doença severa no Japão. Os sinais clínicos consistem de febre, lesões erosivas e ulcerativas na cavidade oral e na mucosa esofágica e edema na pele. A mortalidade pode atingir 10% do rebanho. Lesões degenerativas na musculatura são encontradas no esôfago, laringe, língua e musculatura esquelética. Laminite e problemas de casco podem também ser observados. Nos animais gestantes, pode ocorrer morte fetal e, se a infecção ocorrer entre os dias 70 e 120 de gestação, pode ocorrer o nascimento de animais com hidrocefalia, malformações fetais e distúrbios neurológicos.

Os achados macroscópicos e microscópicos da EHD são caracterizados por hemorragias, que vão desde petéquias a equimoses, e envolvem diferentes tecidos e órgãos, sendo mais freqüente o envolvimento do coração, fígado, baço, rim, pulmão e trato gastrointestinal. Edema generalizado e aumento do fluido pericárdico são achados freqüentes. As alterações encontradas são consequências da degeneração das células endoteliais dos vasos sanguíneos e da interferência no processo de coagulação.

5.6.3 Diagnóstico

Uma combinação do histórico, epidemiologia, características clínicas e achados macroscópicos podem levar à suspeita da EHD. No entanto, pelas similaridades com outras enfermidades, o isolamento e identificação do vírus são essenciais para o diagnóstico conclusivo. A ocorrência sazonal e o quadro de hemorragias generalizadas são características que fortalecem a suspeita clínica. No diagnóstico diferencial, devem ser consideradas a BT, febre aftosa, fotossensibilização e febre catarral maligna.

Na doença em cervídeos, os melhores tecidos para o isolamento e/ou identificação do agente ou seus produtos são baço e linfonodos, seguidos de fígado, pulmão e coração. O sangue total, coletado com anticoagulantes, é a amostra indicada para a pesquisa do EHDV e do vírus Ibaraki. O material deve ser enviado sob refrigeração ao laboratório. Tecidos fixados em formol, para análise histopatológica, também podem ser coletados. O soro, principalmente nos casos de doença crônica, pode ser útil, e, se possível,

o soro pareado deve ser coletado. O diagnóstico definitivo baseia-se no isolamento e identificação do agente. Dentre os métodos mais sensíveis, utilizados para o isolamento, estão a inoculação intravenosa em ovos embrionados seguida da inoculação em cultivo celular.

5.6.4 Controle e profilaxia

Não existe tratamento efetivo e não há vacinas disponíveis para a doença causada pelo EHDV. No Japão, está disponível uma vacina viva atenuada contra a doença de Ibaraki.

Existem poucas medidas práticas para prevenir a infecção, entretanto, o controle de vetores através de alterações nas condições ambientais que desfavoreçam a multiplicação dos *Culicoides* e o uso de inseticidas e larvicidas são medidas que, teoricamente, reduzem o risco da infecção.

6 Bibliografia consultada

- ALFIERI, A.A. et al. Characterization of human rotavirus genotype P[8],G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. **Archives of Virology**, v.141, p.2353-2364, 1996.
- ALFIERI, A.A. et al. Evidências do envolvimento de rotavírus na diarreia do pré e pós-desmame dos suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.291-300, 1991.
- ALFIERI, A.A. et al. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p.521-526, 2006.
- ALFIERI, A.F. et al. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1998. **Veterinary Microbiology**, v.99, p.167-173, 2004.
- ALTENBURG, B.C.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. **The Journal of General Virology**, v.46, p.75-85, 1980.
- BARREIROS, M.A.B. et al. An outbreak of diarrhoea in one week-old piglets caused by group A rotavirus genotype P[7],G3 and P[7],G5. **Veterinary Research Communications**, v.27, p.505-512, 2003.
- BARREIROS, M.A.B. et al. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrheic calves Born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strains. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.51, p.104-109, 2004.
- BAYLIS, M. The reemergence of bluetongue. **Veterinary Journal**, v.164, p.5-6, 2002.
- CLAVIJO, A. et al. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. **The Veterinary Record**, v.151, p.301-302, 2002.
- CONNER, M.E.; MATSON, D.O.; ESTES, M.K. Rotavirus vaccines and vaccination potential. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.185, p.285-337, 1994.
- COSTA, J.R.R. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.273-275, 2006.
- ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.54, p.1747-1785.
- ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Reviews**, v.53, p.410-449, 1989.
- FUKUDOME, K.; YOSHIE, O.; KONNO, T. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. **Virology**, v.172, p.196-205, 1989.
- GALLEGOS, C.O.; PATTON, J.T. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. **Virology**, v.172, p. 616-627, 1989.
- GENTSCH, J.R. et al. Review of G and P typing results from a global collection of strains: Implications for vaccine development. **The Journal of Infectious Diseases**, v.174, p.30-36, 1996.
- GERNA, G. et al. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains G6 specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.9-16, 1992.
- GIBBS, E.P.J.; GREINER, E.C. The epidemiology of bluetongue. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, p.207-220, 1994.
- GONZALES, R.A. et al. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. **Archives of Virology**, v.145, p.1963-1973, 2000.
- GONZALEZ, S.A. et al. Structure of rearranged genome segment 11 in two different rotavirus strains generated by a similar mechanism. **The Journal of General Virology**, v.70, p.1329-1336, 1989.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1333-1337, 1994.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1338-1340, 1994.
- GOUVEIA, A.M.G. et al. Língua Azul em ovinos e caprinos em Minas Gerais. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BUIATRIA, 11.; CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA,

- 5., 2003; CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA, 3., 2003, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: [s.n.], 2003. p.51-52.
- GROOCOCH, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.160-164, 1982.
- HUANG, J.A. et al. Molecular and serological analyses of two rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.85-92, 1992.
- HUSSEIN, H.A. et al. Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3, and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction-derived cDNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2491-2496, 1993.
- JOHNSON, M.W. et al. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. **Veterinary Medicine**, v.87, p.382-386, 1992.
- KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.55, p.1787-1833.
- LAENDER, J.O. et al. Levantamento das espécies de Culicoides Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) encontradas nas mesorregiões norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri, Minas Gerais, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v.11, p.145-157, 2004.
- LAENDER, J.O. **Língua azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise da evidência clínica e sorológica e identificação de Culicoides sp.** 2002. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- LAGER, I.A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, v.40, p.89-93, 2004.
- LIPRANDI, F. et al. Characterization of rotaviruses isolated from pigs with diarrhoea in Venezuela. **Veterinary Microbiology**, v.13, p.37-45, 1987.
- LOBATO, Z.I.P. Língua azul: a doença nos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.515-523, 1999.
- LUCCHELLI, A. et al. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.169-174, 1992.
- LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v.3, p.1145-1156, 2001.
- MATTION, N.M. et al. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology**, v.181, p.295-304, 1991.
- McNULTY, M.S.; CURRAN, W.L.; McFERRAN, J.B. The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. **The Journal of General Virology**, v.33, p.503-508, 1976.
- MEBUS, C. et al. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **University of Nebraska Research Bulletin**, v.23, p.30-35, 1969.
- MELLOR, P.S. Culicoides: vectors, climate change and disease risk. **Veterinary Bulletin**, v.66, p.301-306, 1996.
- MOORE, D. Symposium on neonatal calf diarrhea. **Veterinary Medicine**, v.84, p.793, 1989.
- MURPHY, F.A. et al. Reoviridae. In: **Veterinary Virology**, 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. p.391.
- MURRAY, P.K.; EATON, B.T. Vaccines for bluetongue. **Australian Veterinary Journal**, v.73, p.207-210, 2006.
- NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studies from the perspective of genogroup. **Microbiology and Immunology**, v.37, p.337-348, 1993.
- NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. **Archives of Virology**, v.120, p.43-55, 1991.
- OIE. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. 4.ed. Paris, France: OIE, 2000. Disponível em: http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E_summry.htm. Acesso em: 10 out. 2002.
- OSBURN, B.I. Bluetongue virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, p.547-560, 1994a.
- OSBURN, B.I. The impact of bluetongue virus on reproduction. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, p.189-196, 1994b.
- PARSONSON, I.M. Overview of bluetongue infection of sheep. In: WALTON, T.E.; OSBURN, B.I. (eds). **Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbivirus**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p.713-724.
- PATTON, J. T.; SPENCER, E. Genome replication and packaging of segmented-double stranded RNA viruses. **Virology**, v.277, p.2147-225, 2000.
- PAUL, P.S.; LYOO, Y.S. Immunogens of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.299-317, 1993.
- PEREIRA, H.G. et al. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.245-250, 1983.
- PESAVENTO, J.B.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V.V. Structural organization of the genome in rotavirus. In: DESSELBERGER, U.; GRAY, J. (Eds). **Viral gastroenteritis**, v.9. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p.115-128.
- PRASAD, B.V.V.; ESTES, M.K. Molecular basis of rotavirus replication. In: CHIU, W.; BURNETT, R.M.; GARCEA, R.L. (Eds).

- Structural biology of viruses**, Oxford: Oxford University Press, 1997. p.239-268.
- PRASAD, G. et al. Trends in bluetongue virus diagnostics: A review. **Indian Journal of Animal Science**, v.70, p.103-109, 2000.
- REINHARDT, G. et al. Diarrhea neonatal. Infeccion por rotavirus em bovinos y porcinos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.18, p.23-27, 1986.
- ROY, P. Orbivirus. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.56, p.1835-1869.
- RUIZ, M.C; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious. **Cell Calcium**, v.28, p.137-149, 2000.
- RUSSEL, H. et al. Comparative effects of bluetongue virus infection of ovine and bovine endothelial cells. **Veterinary Pathology**, v.33, p.319-331, 1996.
- SAIF, L.J. Nongroup A rotaviruses. In: SAIF, L. J.; THEIL, K.W. (Eds). **Viral diarrheas of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.73-95.
- SAIF, L.J.; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of Humans and Animals. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.185, p.339-371, 1994.
- SATO, K. et al. Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus. **Veterinary Microbiology**, v.2, p.83-87, 1977.
- SATO, M.; AKASHI, H. Detection of bovine coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.55, p.771-774, 1993.
- SNODGRASS, D.R. et al. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.504-507, 1990.
- SUZUKI, Y. et al. Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotavirus isolated in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.3046-3049, 1993.
- TAMEHIRO, C.Y. et al. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.349-353, 2003.
- TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. Diversity in rotavirus genomes. **Virology**, v.6, p.123-131, 1995.
- TOMICH, R.G.P. et al. **Epidemiologia do Vírus da Língua Azul em Rebanhos Bovinos**. Corumbá: EMBRAPA PANTANAL, 2006. Doc 85. Disponível em: www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC85. Acesso em: 18 nov. 2006.
- WARD, M.P.; CARPENTER, T.E.; OSBURN, B.I. Host factors affecting seroprevalence of bluetongue virus infections of cattle. **American Journal of Veterinarian Research**, v.55, p.916-920, 1994.
- WENTZ, M.J.; PATTON, J.T.; RAMIG R.F. The 3' terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. **Journal of Virology**, v.70, p.7833-7841, 1996.
- WOODE, G.N. et al. Antigenic relationships among some rotavirus: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. **Journal Clinical of Microbiology**, v.18, p.358-364, 1983.
- WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus infected semen. **Theriogenology**, v.65, p.247-274, 2006.
- ZABEREZHNY, A.A.; LYOO, Y.S.; PAUL, P.S. Prevalence of P types among porcine rotaviruses using subgenomic VP4 gene probes. **Veterinary Microbiology**, v.39, p.97-110, 1994.

1 Introdução	811
2 Classificação	811
3 Estrutura dos vírions	811
3.1 O genoma	812
4 Replicação	815
5 Retrovírus de interesse veterinário	819
5.1 Vírus da leucose bovina	819
5.1.1 Epidemiologia	819
5.1.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	820
5.1.3 Diagnóstico	821
5.1.4 Profilaxia e controle	822
5.2 Vírus da imunodeficiência bovina	823
5.2.1 Epidemiologia	823
5.2.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	824
5.2.3 Diagnóstico e controle	824
5.3 Vírus da pneumonia progressiva dos ovinos (Maedi-Visna)	824
5.3.1 Epidemiologia	824
5.3.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	825
5.3.3 Diagnóstico e controle	825
5.4 Vírus da artrite-encefalite caprina	826
5.4.1 Epidemiologia	826
5.4.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	827
5.4.3 Diagnóstico e controle	827
5.5 Vírus da adenomatose pulmonar dos ovinos	828
5.5.1 Epidemiologia	828
5.5.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	828
5.5.3 Diagnóstico e controle	829

5.6 Vírus da anemia infecciosa eqüina	829
5.6.1 Epidemiologia	829
5.6.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	830
5.6.3 Diagnóstico e controle	830
 5.7 Vírus da leucemia felina	 831
5.7.1 Epidemiologia	831
5.7.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	832
5.7.3 Diagnóstico e controle	832
 5.8 Vírus da imunodeficiência felina	 833
5.8.1 Epidemiologia	833
5.8.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	834
5.8.3 Diagnóstico	834
5.8.4 Controle e profilaxia	835
 5.9 Vírus da leucose aviária	 835
5.9.1 Epidemiologia	835
5.9.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade	836
5.9.3 Diagnóstico e controle	836
 6 Bibliografia consultada	 836

1 Introdução

A família *Retroviridae* é composta por um grande número de vírus que podem ser encontrados em, virtualmente, todos os vertebrados. Os retrovírus possuem vírions envelopados e apresentam duas moléculas idênticas de RNA de fita simples linear como genoma. Os membros dessa família são assim denominados por possuírem uma enzima capaz de sintetizar uma molécula de DNA pela transcrição do seu genoma, mecanismo chamado de transcrição reversa. A enzima que cataliza esta reação – a transcriptase reversa (RT) – é um componente dos vírions e possui, ainda, outras atividades essenciais para a replicação viral. A etapa de transcrição reversa se constitui no evento central da multiplicação dos retrovírus. O ciclo replicativo dos retrovírus envolve também uma etapa de integração da cópia DNA do seu ácido nucléico no genoma da célula hospedeira, etapa essencial para a expressão gênica e para a produção de progênie viral. Esse evento faz com que as infecções pelos retrovírus assumam um caráter persistente, ou seja, uma vez infectados, os hospedeiros se tornam portadores do agente pelo resto da vida. Alguns retrovírus também têm sido descritos como indutores de tumores em humanos e animais.

Os retrovírus foram responsáveis por dois marcos importantes nas Ciências Biológicas, ambos relacionados com a descrição da enzima RT – DNA polimerase dependente de RNA – por Howard Temin, em 1970, que lhe valeu o prêmio Nobel. O primeiro refere-se à quebra de um paradigma: até então se acreditava que a transcrição só ocorria de DNA para RNA. O segundo, baseado justamente nesta característica, proporcionou grandes avanços na Biologia Molecular, pela utilização de enzimas com essa propriedade na obtenção de DNA complementar (cDNA) aos RNA mensageiros (mRNA).

Os retrovírus podem ser encontrados em praticamente todas as espécies de animais domésticos, com significado clínico e sanitário variáveis. Dentre os retrovírus de importância veterinária, destacam-se o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), o vírus da leucose bovina (BLV), o Maedi-Visna de ovinos, o vírus da artrite e en-

cefalite caprina (CAEV), os vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucose aviária (ALV), entre outros.

Nas duas últimas décadas, um número expressivo de pesquisas relacionadas aos retrovírus foi publicado, pesquisas essas motivadas a partir da identificação e da importância adquirida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esse vírus foi classificado no gênero *Lentivirus*, em função de sua similaridade com o vírus Maedi-Visna.

Além de sua importância como patógenos de animais, vários lentivírus têm sido também estudados como modelos para o HIV, em estudos de patogenia e na pesquisa e desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas. O BLV, que é um *Deltaretrovirus*, também tem sido utilizado como modelo para o vírus da leucemia dos linfócitos T de humanos (HTLV).

Neste capítulo, serão abordados aspectos relacionados aos principais retrovírus de animais domésticos, com ênfase naqueles de maior importância em nosso meio.

2 Classificação

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee of Viral Taxonomy – ICTV*), a família *Retroviridae* está dividida em duas subfamílias, sendo cada subfamília dividida em gêneros (Tabela 31.1). A divisão em subfamílias baseia-se mais em propriedades patogênicas do que em critérios moleculares. A análise de homologia de nucleotídeos, estrutura e organização genômica permite a divisão em grupos. A maioria dos retrovírus de importância em veterinária está classificada na subfamília *Orthoretrovirinae*; na subfamília *Spumaretrovirinae*, os *Spumavirus* ainda não foram associados com doenças.

3 Estrutura dos vírions

Os vírions dos retrovírus contêm duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 10 kb cada. Nesse sentido, são os únicos vírus animais a possuírem duas cópias do genoma nos vírions e, por isso, são ditos *diplóides*. O genoma viral encontra-

Tabela 31.1. Vírus da família *Retroviridae* de importância em Medicina Veterinária.

Subfamília	Gênero	Espécie viral
Orthoretrovirinae	<i>Alpharetrovirus</i>	Vírus da leucose aviária (ALV)
	<i>Betaretrovirus</i>	Jaagsiekte (JSRV; adenocarcinoma ovino)
	<i>Gamaretrovirus</i>	Vírus da leucemia felina (FeLV)
	<i>Deltaretrovirus</i>	Vírus da leucose bovina (BLV)
	<i>Epsilonretrovirus</i>	Nenhum associado com doença animal
	<i>Lentivirus</i>	Vírus da imunodeficiência bovina (BIV)
		Vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV)
		Vírus da imunodeficiência felina (FIV)
		Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)
		Vírus Maedi Visna dos ovinos (MVV)
Spumaretrovirinae	<i>Spumavirus</i>	Nenhum associado com doença animal

se altamente condensado e associado com múltiplas cópias da nucleoproteína (NC), formando o núcleo ou *core*. Neste núcleo também estão presentes algumas proteínas que desempenham funções catalíticas durante a replicação: a protease (PR), a RT e a integrase (IN). Esse complexo está contido em um capsídeo de forma esférica ou cônica, formado pela associação de cópias múltiplas da proteína do capsídeo (CA). O nucleocapsídeo (*core* + capsídeo) é revestido externamente por uma camada formada por centenas ou milhares de cópias da proteína da matriz (MA). Essa camada é recoberta por um envelope lipoprotéico, no qual se encontram as duas glicoproteínas virais, a transmembrana (TM) e a de superfície (SU). A TM é uma proteína integral de membrana, ou seja, apresenta uma região transmembrana; a SU está localizada externamente no vírion, associada de forma não-covalente com a região externa da TM. As partículas víricas dos retrovírus são liberadas das células infectadas ainda imaturas. A maturação ocorre no meio extracelular, pela clivagem dos precursores protéicos e rearranjos estruturais nas estruturas víricas internas, o que resulta em mudanças na aparência dos vírions sob microscopia eletrônica. As partículas madu-

ras dos retrovírus são, aproximadamente, esféricas e possuem um diâmetro que varia entre 80 e 120 nm para os diferentes vírus. A Figura 31.1 apresenta uma fotografia de microscopia eletrônica e uma ilustração esquemática de partículas víricas dos retrovírus.

3.1 O genoma

O genoma RNA dos membros da família *Retroviridae* possui entre sete e 13 kb, dependendo do vírus, e contém três genes principais: *gag*, *pol* e *env*. O gene do antígeno específico de grupo (*group antigen – gag*) codifica as proteínas MA, a NC e a CA. O gene *pol* codifica as enzimas RT, IN e PR. O gene *env* codifica as proteínas do envelope (TM e SU). As proteínas Gag, Pol e Env são sintetizadas como poliproteínas precursoras e são clivadas somente na fase final do ciclo, durante o egresso e mesmo após, dando origem às proteínas individuais. A Figura 31.2 apresenta uma ilustração da estrutura e organização do genoma dos lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV), e a Figura 31.3 apresenta uma comparação da estrutura e organização genômica (provírus) de diferentes retrovírus.

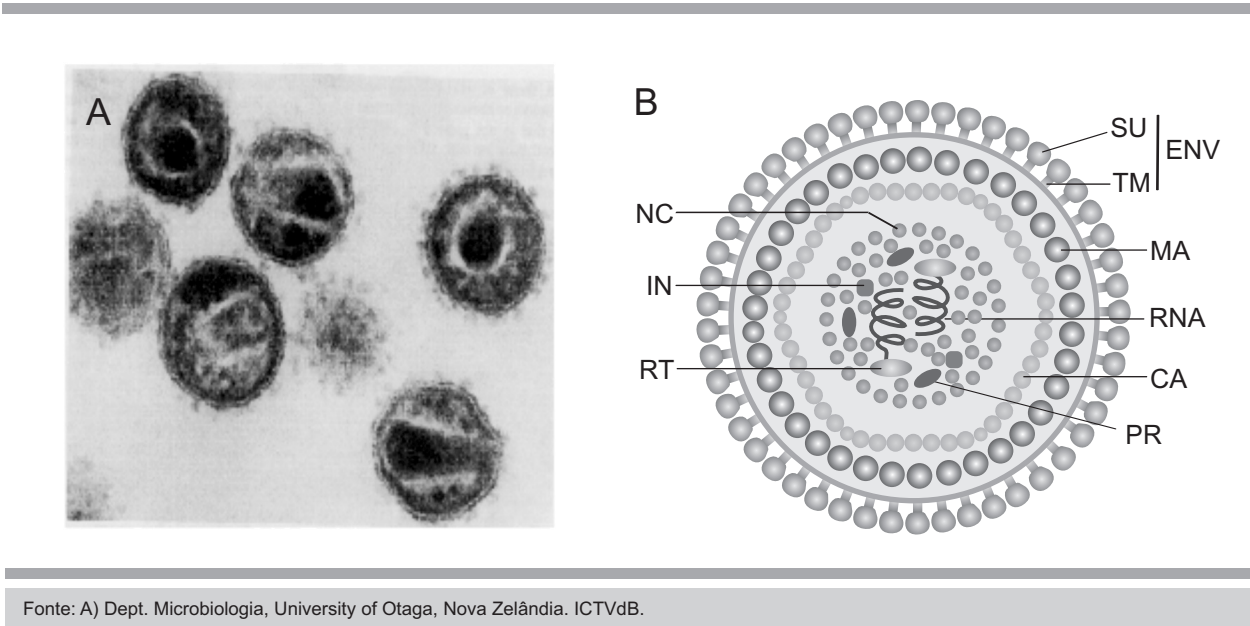


Figura 31.1. Vírions da família *Retroviridae*. A) Fotografia de microscopia eletrônica de partículas do HIV; B) Ilustração esquemática de um vírion mostrando os seus componentes. RNA: genoma; NC: proteína do nucleocapsídeo; CA: capsídeo; MA: matriz; IN: integrase; RT: transcriptase reversa; PR: protease; TM: glicoproteína transmembrana; SU: glicoproteína de superfície, ENV: envelope.

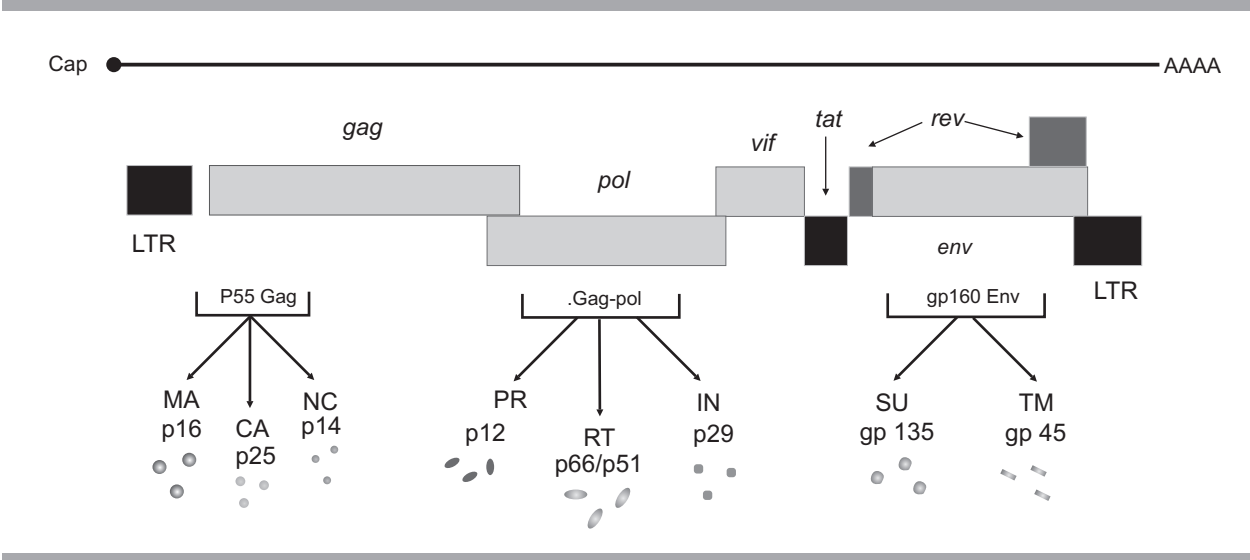


Figura 31.2. Organização do genoma e do provírus DNA dos lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV ou CAEV e MVV), com as proteínas codificadas. LTR: região repetida terminal. Genes: gag (antígenos específicos de grupo); pro (protease); pol (polimerase); env (envelope). Proteínas: MA: proteína da matriz; CA: proteína do capsídeo; NC: proteína do nucleocapsídeo; RT: transcriptase reversa; IN: integrase; PR: protease; TM: proteína transmembrana; SU: glicoproteína de superfície. Os produtos dos genes tat, vif e rev são proteínas acessórias com funções regulatórias. Os números abaixo de cada proteína referem-se à respectiva massa molecular.

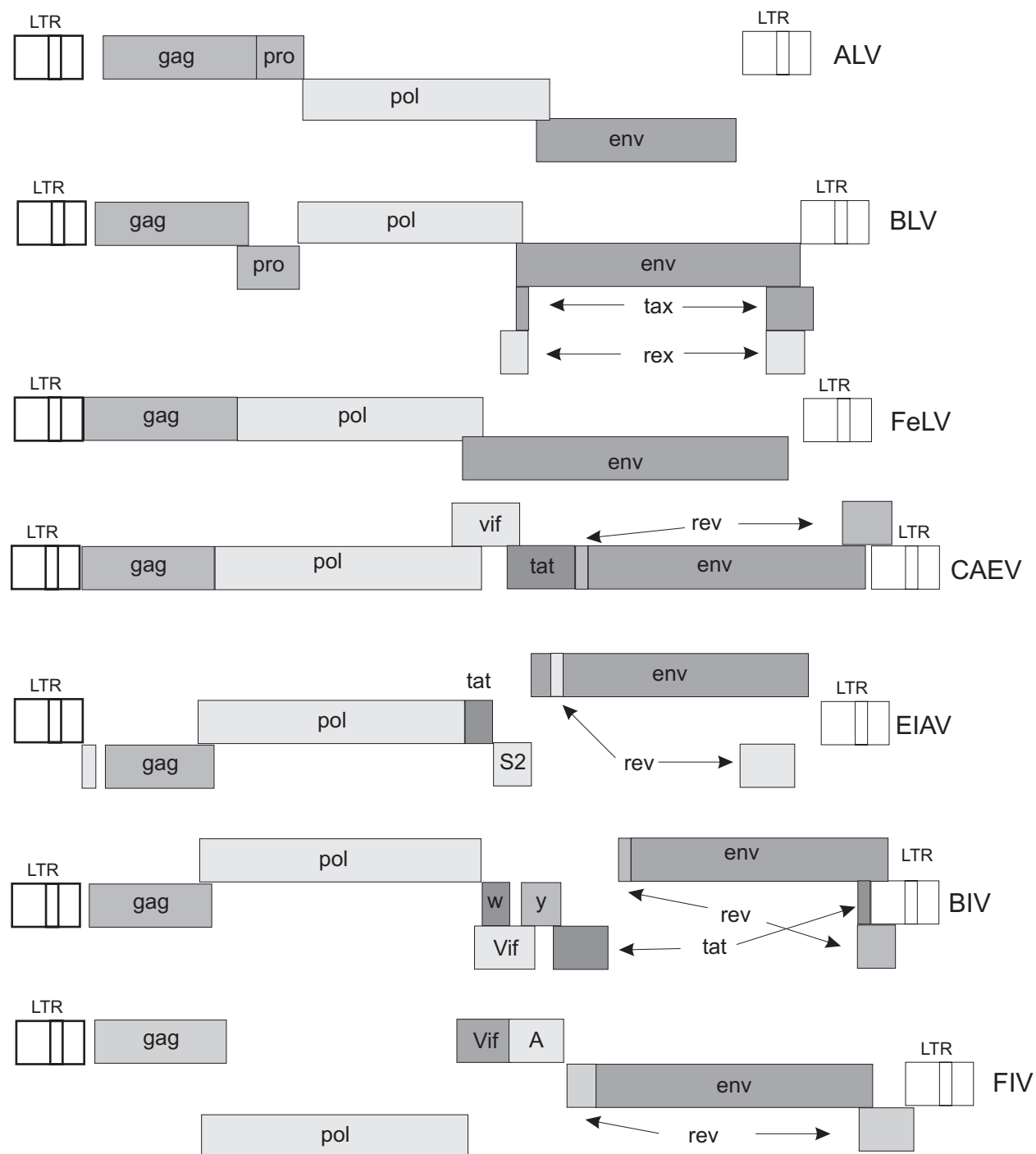


Figura 31.3 Estrutura comparativa do genoma de diferentes retrovírus de animais domésticos. ALV: vírus da leucose aviária; BLV: vírus da leucose bovina; FeLV: vírus da leucemia felina; CAEV: vírus da artrite-encefalite caprina; EIAV: vírus da anemia infecciosa eqüina; BIV: vírus da imunodeficiência bovina; FIV: vírus da imunodeficiência felina; LTR: região repetida terminal. Genes gag (antígenos específicos de grupo); pro (protease); pol (polimerase); env (envelope). Genes acessórios: tax, rex, rev, vif, tat etc.

O RNA genômico é produzido pela transcrição do provírus integrado no cromossomo da célula hospedeira, reação que é catalisada pela maquinaria celular de transcrição. Por isso, o genoma viral contém uma estrutura *cap* em sua extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. O genoma possui seqüências envolvidas na expressão gênica e na replicação, localizadas próximas às extremidades: as regiões R (de repetida) e U5 (única da extremidade 5') estão próximas à extremidade 5'; as seqüências R e U3 se localizam próximas à extremidade 3'. O processo de transcrição reversa resulta na duplicação das regiões únicas (U5 e U3), o que faz com que a molécula de DNA resultante – denominada *provírus* – contenha seqüências idênticas nas duas extremidades, as regiões longas terminais (*Long Terminal Repeat*, LTR). Cada LTR apresenta as seguintes seqüências, nesta ordem: U3-R-U5. Na região U3, estão localizadas as principais seqüências de ligação para os fatores de transcrição, enquanto o início da região R corresponde ao início da transcrição. Essas seqüências são necessárias para a transcrição do provírus, que somente ocorre após a sua integração ao genoma da célula hospedeira.

Alguns retrovírus, incluindo os lentivírus, possuem genes adicionais, denominados acessórios ou auxiliares. Esses vírus são denominados retrovírus *complexos*, enquanto aqueles que não possuem estes genes são denominados retrovírus *simples*. Os produtos desses genes participam da regulação de diversas etapas da replicação viral. O HIV parece conter o maior número de genes acessórios. Três desses genes foram igualmente descritos em lentivírus de animais: os genes *tat*, *rev* e *vif*. O gene *tat* não parece ser essencial, enquanto a deleção do gene *rev* impede a produção de progênie viral. A função da proteína Rev consiste em facilitar a exportação de determinados mRNA virais do núcleo para o citoplasma, onde serão traduzidos. Esses mRNAs contêm uma seqüência para a ligação da Rev (RRE – *rev responsive element*) localizada na região central do gene *env*.

4 Replicação

O ciclo replicativo dos retrovírus pode ser dividido em duas fases. A primeira fase, que ocor-

re após a penetração e desnudamento, envolve a síntese de uma cópia DNA (provírus) a partir do genoma RNA, transporte do provírus até o interior do núcleo e a sua integração no cromossomo da célula hospedeira. Uma parte dessas etapas ocorre no citoplasma; e a outra parte, no núcleo, e são mediadas por proteínas presentes nos vírions (RT, IN). A segunda fase envolve a síntese e processamento de mRNAs e síntese das proteínas virais. Essas etapas utilizam a maquinaria celular de transcrição e processamento de mRNAs e de síntese protéica, respectivamente. A morfogênese inicia pelo encapsidamento do genoma, juntamente com as enzimas virais, por precursores das proteínas estruturais. A morfogênese é completada pelo brotamento do nucleocapsídeo na membrana plasmática. O processamento final dos precursores protéicos, dando origem às proteínas estruturais maduras, ocorre já no interior dos vírions extracelulares.

A infecção inicia pelo reconhecimento e ligação dos vírions à superfície das células-alvo. Este evento é mediado pela glicoproteína SU do envelope, que interage com receptores específicos da membrana plasmática. Vários receptores para retrovírus já foram identificados, incluindo os receptores para o FIV, FeLV e BLV. A maioria dos retrovírus infecta células do sistema imunológico, como as células da linhagem monocítica/macrofágica e/ou linfocítica.

A etapa seguinte consiste na fusão do envelope viral com a membrana plasmática, processo que envolve interações da proteína TM com componentes da membrana e que resulta na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Essa fusão independe da redução de pH e ocorre na superfície da célula. Além do genoma e das proteínas NC e CA, o nucleocapsídeo contém algumas moléculas das enzimas RT, IN e PR. A primeira etapa após a penetração e desnudamento do genoma é a síntese do DNA proviral – mecanismo denominado de *transcrição reversa*. O processo se inicia em uma seqüência denominada de sítio de ligação do *primer* (*primer binding site*, PBS), localizada próxima da região U5, onde ocorre a ligação de um RNA transportador (tRNA celular que está presente nos vírions). Inicialmente é sintetizada a fita de DNA complementar (cDNA), iniciando pela síntese das regiões U5 e R. O DNA de fita

simples recém-sintetizado desloca-se, então, para a extremidade 3' (primeiro salto), ocorrendo o pareamento com a região R, e a síntese prossegue até a sequência PBS. À medida que a transcrição avança, a fita de RNA é degradada pela atividade da ribonuclease H (RNase H) da enzima RT, a qual é igualmente responsável pela liberação do *primer* de RNA, que possibilita a síntese da fita complementar do DNA proviral. A seguir, ocorre um segundo salto, com o pareamento da região PBS entre as duas fitas, que culmina com a formação da molécula de DNA de fita dupla, denominada provírus.

A atividade da enzima RT é parcialmente responsável pela variabilidade observada no genoma dos retrovírus. Essa enzima comete erros ao transcrever o RNA genômico em DNA, com uma frequência de um em cada 10^3 - 10^4 nucleotídeos incorporados. Isso equivale a uma mutação em cada novo genoma produzido, considerando-se que o genoma dos retrovírus apresenta aproximadamente 10.000 nt. Esta taxa de mutação é significativamente maior, comparando-se com as enzimas de replicação do DNA celular, cuja frequência de erros é estimada em um em cada 10^9 .

O provírus DNA de fita dupla é, então, transportado para o núcleo da célula, onde é inserido no cromossomo celular pela atividade da IN. Essa enzima possui também atividade endonuclease, que é necessária para clivar o DNA celular para a integração do provírus. A etapa de inserção resulta na incorporação definitiva de uma cópia do genoma viral (na forma de DNA) no cromossomo do hospedeiro e se constitui em uma etapa essencial para o prosseguimento do ciclo replicativo e produção de progênie viral.

Após ser integrado no cromossomo da célula hospedeira, o provírus DNA é transcrito pela RNA polimerase II e fatores de transcrição celulares para a síntese de mRNAs destinados à produção das proteínas virais. Os transcritos primários originam duas classes de mRNA: mRNA subgenômicos e mRNAs com a extensão total do genoma. Os mRNA subgenômicos foram submetidos a processamento por *splicing*, exportados para o citoplasma, onde serão traduzidos nas proteínas do envelope (Env, que, após clivagem,

dará origem às proteínas TM e SU) e nas proteínas acessórias (nos retrovírus que as possuem). Os mRNA com a extensão do genoma serão traduzidos nas proteínas *gag* e *pol* (precursoras das proteínas MA, NC e CA; e RT, IN e PR, respectivamente), e também serão encapsidados em nucleocapsídeos pela NC e CA. Ambas as classes de mRNAs possuem *cap* na extremidade 5' e são poliadeniladas na extremidade 3'. As etapas da replicação do genoma e a estrutura das moléculas intermediárias (provírus) estão apresentadas na Figura 31.4. As etapas tardias do ciclo, com o destino dos diferentes RNA transcritos a partir do

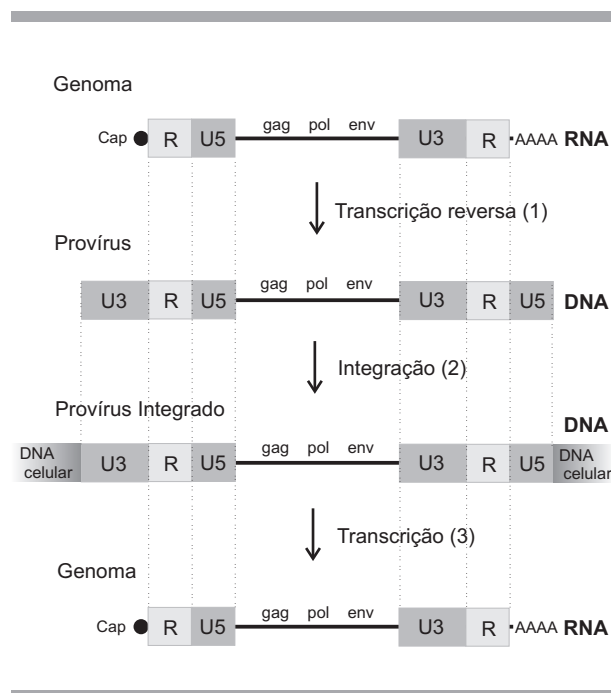


Figura 31.4. Etapas da replicação do genoma dos retrovírus e estrutura das moléculas intermediárias. O genoma é constituído por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples com 5' cap e poliA. Próximo às extremidades, o genoma possui duas regiões repetidas R (5' e 3') e duas regiões únicas (U5 e U3). Entre essas regiões, localizam-se as sequências codificantes: genes *gag*, *pol* e *env*. A primeira etapa da replicação é síntese do provírus DNA (molécula de DNA de fita dupla correspondente ao genoma) pela enzima viral transcriptase reversa (1). O provírus contém as regiões U3 e U5 duplicadas nas extremidades opostas e é integrado aos cromossomos celulares pela ação da enzima viral integrase (2). Após a integração, o provírus é transcrito pela RNA polimerase II celular (3), originando mRNAs idênticos ao genoma. Esses mRNAs servem para a tradução em proteínas e também constituem o RNA genômico para serem encapsidados na progênie viral.

provírus integrado e a morfogênese dos vírions estão apresentadas na Figura 31.5.

A transcrição do genoma dos retrovírus que possuem genes acessórios (p. ex., os lentivírus), ocorre em duas fases: uma fase precoce, quando

são transcritos os mRNA que codificam as proteínas envolvidas na regulação da replicação viral; uma fase tardia, em que ocorre a exportação do núcleo para o citoplasma mRNAs que serão traduzidos nas proteínas estruturais.

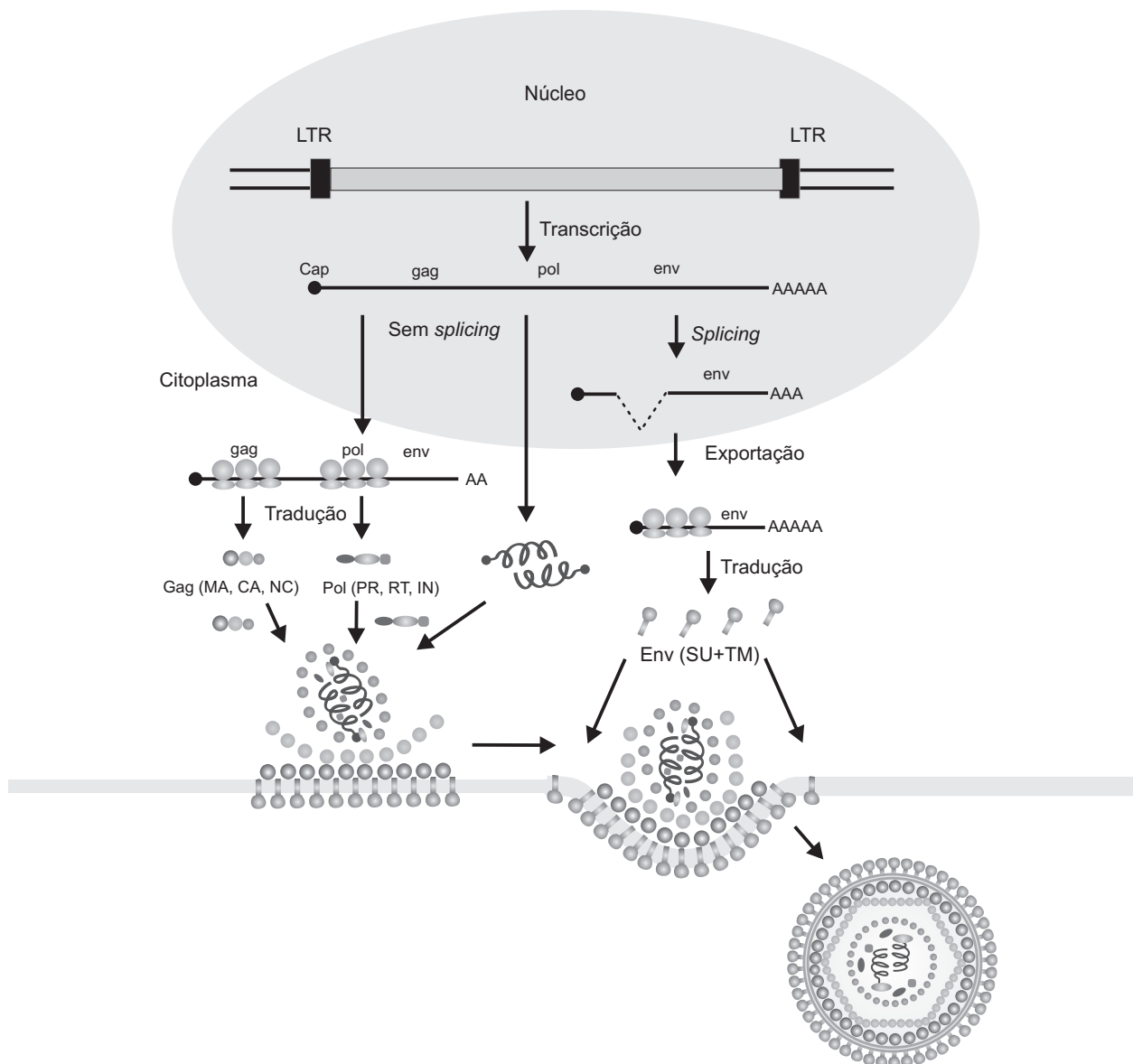


Figura 31.5. Etapas tardias da replicação dos retrovírus. O provírus DNA integrado ao cromossomo celular é transcrito pela RNA pol II celular em toda a sua extensão, gerando transcritos com cap e poli-A. Uma parte desses transcritos é exportada do núcleo sem sofrer *splicing* e serve de mRNA para a síntese da poliproteína do gene gag e das proteínas do gene pol. A outra parte destes mRNAs, que não sofre processamento, é exportada do núcleo e servirá de RNA genômico. Em fases tardias do ciclo, uma população de transcritos sofre *splicing* e serve de mRNA para a tradução em uma poliproteína (Env) que originará as glicoproteínas do envelope. Esta poliproteína é transportada para a membrana plasmática, onde as proteínas TM e SU são geradas por clivagem e ficam associadas à membrana que dará origem ao envelope viral. As poliproteínas dos genes gag e pol são transportadas para a membrana plasmática, onde interagem com o RNA genômico e com as caudas das glicoproteínas, membrana, resultando na formação do nucleocapsídeo e brotamento das partículas víricas. A maturação completa das proteínas precursoras ocorre em partículas víricas extracelulares.

A morfogênese é uma etapa pouco conhecida do ciclo replicativo dos retrovírus e parece apresentar algumas diferenças entre os vírus. Para a maioria dos vírus, as etapas de montagem do nucleocapsídeo (interações RNA + NC + CA) e brotamento na membrana parecem ocorrer simultaneamente. Em outros, os nucleocapsídeos são inicialmente montados no citoplasma e transportados até a membrana plasmática, onde interagem com a proteína MA e com as caudas das glicoproteínas, resultando no brotamento e egresso. De qualquer forma, estes eventos ocorrem no citoplasma, e as partículas víricas são liberadas sem a necessidade de lise celular. Durante a morfogênese, são incluídas algumas moléculas das enzimas virais RT, IN e PR nas partículas recém-formadas. O ciclo replicativo dos retrovírus está ilustrado esquematicamente na Figura 31.6.

O estudo da replicação dos retrovírus pode ser realizado *in vitro*, em diferentes tipos celular-

es. Por outro lado, a infecção de cada retrovírus *in vivo* parece estar restrita a um determinado hospedeiro e a poucos tipos celulares, restrição principalmente relacionada com a presença dos receptores virais.

Apesar de serem considerados predominantemente espécie-específicos, alguns retrovírus podem infectar mais de uma espécie animal. A infecção cruzada de caprinos e ovinos pelo CAEV e MVV foi descrita por vários autores, que sugeriram a denominação lentivírus de pequenos ruminantes (SLRV – *small ruminant lentivirus*) para esses vírus. Provavelmente, a proximidade filogenética entre essas espécies favoreça a infecção cruzada. Por outro lado, estudos recentes demonstraram que o CAEV é capaz de infectar bovinos – igualmente ruminante – experimentalmente, apesar de a infecção não persistir.

A replicação de vários lentivírus em células de cultivo resulta na produção de efeito citopá-

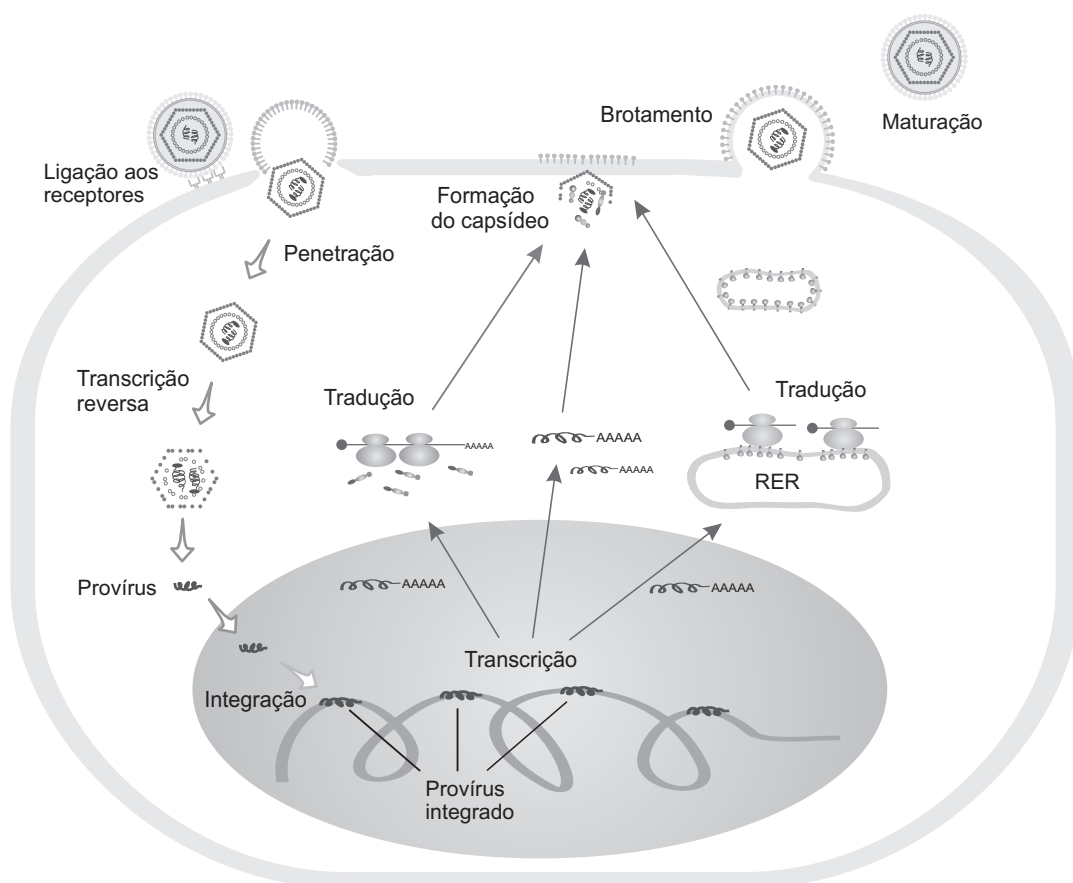


Figura 31.6. Ilustração simplificada do ciclo replicativo dos retrovírus.

tico, caracterizado pela formação de células gigantes multinucleadas ou sincícios. A replicação *in vitro* de outros retrovírus pode levar à morte da célula devido ao acúmulo de partículas virais (superinfecção). Isso tem sido observado com algumas cepas do ALV e em variantes do FeLV.

5 Retrovírus de interesse veterinário

O número de retrovírus que infecta animais é muito grande e, por isso, de difícil enumeração e abordagem em um livro texto como este. Portanto, será dada ênfase aos principais retrovírus que causam doenças em animais de companhia e de produção. A ordem de apresentação será de acordo com a espécie animal.

5.1 Vírus da leucose bovina

O BLV (*bovine leukemia virus*), agente etiológico da leucose enzoótica bovina, é classificado como um *Deltaretrovirus* e apresenta muitas similaridades estruturais, genômicas e de patogenicidade com o HTLV-1 e o HTLV-2 (*human T lymphotropic viruses 1 and 2*).

Esse vírus foi descrito, pela primeira vez, em 1871, na Lituânia, em um bovino com hipertrofia de linfonodos superficiais e esplenomegalia. Depois disso, outros casos semelhantes também foram descritos e, em 1917, Kenneth demonstrou que a doença era causada por um agente infeccioso. Em 1976, Kettmann e colaboradores demonstraram que as partículas virais possuíam RNA exógeno e que continham a enzima RT, permitindo sua classificação como um retrovírus oncogênico. O BLV é um retrovírus complexo e, assim como os HTLV-1 e 2, contém genes que codificam produtos acessórios como Tax e Rex, cuja função está relacionada com a regulação da expressão gênica desses vírus.

A variabilidade genômica do BLV não parece ser grande entre isolados, provavelmente devido à taxa de mutação de sua RT ser inferior a de outros retrovírus. Comparativamente, o BLV teria um comportamento similar ao HTLV, em que isolados do Japão, Caribe e África apresentam até 99% de homologia.

5.1.1 Epidemiologia

O BLV está distribuído mundialmente, com exceção de alguns países europeus que erradicaram a infecção a partir da década de 1980. No Brasil, a infecção está amplamente difundida, com níveis variáveis de prevalência entre os rebanhos. Estudos sorológicos já foram realizados em praticamente todas as regiões do país, indicando a ampla distribuição da infecção, com índices de prevalência geralmente maiores em gado leiteiro. Na Serra de Botucatu, SP, foi detectada prevalência de 52% entre animais e de 10 a 67% das propriedades eram positivas. No Rio de Janeiro, 17,3% de 734 animais testados foram positivos. Em um estudo envolvendo aproximadamente 10.000 amostras no Rio Grande do Sul, detectou-se uma prevalência de 8% de animais soropositivos.

Em condições naturais, o vírus pode infectar bovinos, zebuínos, búfalos e capivaras. Infecções experimentais já demonstraram a susceptibilidade de ovinos, caprinos e coelhos. Os coelhos podem desenvolver tumores ou imunodeficiência após um tempo variável de incubação.

Assim como os outros retrovírus, o BLV apresenta uma baixa transmissibilidade, ou seja, não é facilmente transmitido. A transmissão ocorre predominantemente entre animais do mesmo rebanho, e é incomum ocorrer entre rebanhos vizinhos. É comum a existência de regiões onde rebanhos positivos e negativos vizinhos coexistam por longos períodos, sem a disseminação do vírus para os rebanhos livres. Essas observações indicam que um contato mais próximo entre os animais é necessário para a transmissão. A transmissão iatrogênica, pela aplicação de vacinas, uso compartilhado de agulhas hipodérmicas, administração de medicamentos e após o toque retal contribui de forma importante para a disseminação da infecção dentro dos rebanhos.

O vírus está presente no sangue dos animais infectados e é transmitido por procedimentos que envolvam a transferência de células sangüíneas entre animais. Cabe lembrar que os animais infectados tornam-se portadores pelo resto da vida e possuem o vírus no sangue, sobretudo em

linfócitos B. Aproximadamente 1 microlitro de sangue de um animal com linfocitose persistente já pode ser suficiente para transmitir o vírus para outro animal. Assim sendo, a forma iatrogênica parece contribuir de forma importante para a transmissão do vírus. Animais submetidos a procedimentos cirúrgicos ou terapêuticos, como castração, descorna, tatuagem, vacinações, pequenas cirurgias, palpação retal, injeções ou colocação de brincos, sem os devidos cuidados de profilaxia, estão propensos a adquirirem a infecção pelo BLV. A transmissão pela picada de insetos, como os tabanídeos, já foi relatada e parece possuir alguma importância em regiões com alta infestação desses insetos. A presença do vírus já foi descrita na glândula mamária, associada aos linfócitos, bem como no leite, indicando a possibilidade de transmissão através do leite.

Embora o vírus possa ser ocasionalmente encontrado no sêmen de touros, a inseminação artificial não parece ser um meio importante de disseminação do vírus. Não obstante, centrais de coleta de sêmen são desaconselhadas a manter touros positivos. A transmissão pela monta natural pode ocorrer, representando uma forma de disseminação do vírus de touros infectados para fêmeas. Vacas positivas prenhes podem transmitir o vírus para o feto; entretanto, menos de 10% dos animais nascidos dessas fêmeas são portadores do vírus ao nascer. Em outros trabalhos, que analisam a transferência de embriões a partir de doadoras infectadas pelo BLV, não foi detectada transmissão para os embriões ou para as receptoras.

Em países cujos sistemas criatórios mantêm registros detalhados de produtividade, como os EUA, Canadá, Japão e Austrália, estima-se que os efeitos do BLV podem atingir uma redução de até 10% na produção leiteira.

5.1.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

O BLV infecta principalmente linfócitos B, nos quais produz uma infecção persistente, embora também possa infectar linfócitos T. A exem-

plo das infecções pelos outros retrovírus, uma vez infectados os animais tornam-se portadores do agente pelo resto da vida. Na maioria das vezes, a infecção pelo BLV é assintomática, e o reconhecimento dos animais positivos somente é possível pela realização de testes sorológicos.

Entre os animais infectados, aproximadamente 30% desenvolvem uma linfocitose persistente, sem a manifestação de quaisquer sinais clínicos. Estima-se que entre 1 e 5% dos animais infectados persistentemente irão desenvolver a forma clínica da doença em algum momento de suas vidas. A enfermidade (denominada leucose) caracteriza-se pela produção de tumores de origem linfóide, como linfossarcomas ou linfomas malignos, em diversos órgãos. A patogenia dos tumores não está relacionada a oncogenes presentes no genoma viral, mas a proteína viral Tax parece ter um papel importante na sua produção.

Os sinais clínicos são variáveis e estão relacionados com os órgãos e tecidos afetados pelos tumores. Assim, tumores que se desenvolvem no trato gastrointestinal podem ocasionar obstruções ou provocar úlceras, que podem resultar em disfunções digestivas, anorexia e perda de peso. Tumores que atingem a medula espinhal podem resultar em distúrbios neurológicos com manifestações diversas. Alguns sinais clínicos observados em dois grupos de animais com linfossarcoma estão descritos na Tabela 31.2. Aproximadamente dois terços dos animais com tumores apresentam também linfocitose persistente. A forma tumoral do BLV afeta geralmente animais acima de dois anos de idade, com um pico de incidência entre os 5 e 8 anos. Esses tumores devem ser distinguidos da leucose esporádica bovina, que afeta animais com idade inferior a um ano e não está relacionada à infecção pelo BLV.

Os tumores podem afetar um ou vários linfonodos, superficiais ou profundos. Algumas vezes, o infartamento de linfonodos superficiais é o primeiro indicador clínico da ocorrência de linfossarcoma. A partir do reconhecimento clínico, o linfossarcoma possui um curso de tempo variável, mas é virtualmente sempre fatal.

Tabela 31.2. Sinais clínicos associados com a infecção pelo vírus da leucose bovina (BLV).

Sinais clínicos	Grupo 1 ^b (%)	Grupo 2 ^c (%)
Perda de peso	-	80
Agalactia	-	77
Linfoadenopatia (aumento de volume)	58	58
Anorexia	62	52
Paralisia/paresia do posterior	16	41
Febre	-	23
Exoftalmia	9	20
Dificuldade respiratória	-	14
Obstrução intestinal	19	9
Anormalidade no miocárdio	64	7
Linfócitos anormais	63	-

^a Fonte: adaptado de: The Compendium Collection, Infectious Disease in Food and Animal Practice, 1993.
^b Dados de 298 animais hospitalizados.
^c Dados de 1.100 animais de campo.

A viremia é detectável somente nas duas primeiras semanas após a infecção e, tardiamente, a detecção de antígenos virais no sangue é difícil. Alguns trabalhos indicam que, após a infecção inicial, a permanência do vírus no organismo seria mantida principalmente pela divisão celular – da célula contendo o provírus – e não pela replicação do genoma viral via RT. Isso, de certa forma, também ajudaria a explicar a menor variabilidade genômica do BLV, quando comparado com outros retrovírus (p. ex., EIAV), cuja taxa de replicação é maior no curso da infecção.

Os animais infectados desenvolvem uma resposta sorológica entre duas a oito semanas pós-infecção. Os anticorpos são direcionados principalmente contra as glicoproteínas do envelope (TM, SU) e contra as proteínas do capsídeo. Os anticorpos são persistentes, porém os níveis presentes podem variar de acordo com a condição fisiológica e imunológica do animal. Um estudo recente estimou o tempo médio de soroconversão em 47 dias (infecção experimental) e 57 dias (dados de infecção experimental e natural).

O provírus integrado é detectado em, aproximadamente, 30% dos linfócitos circulantes. A expansão da população linfocitária ocorre a partir da proliferação policlonal de linfócitos B, com citologia e cariótipo normais.

Os achados de necropsia incluem aumento generalizado dos linfonodos, tanto superficiais como internos. Ao corte, os linfonodos apresentam uma superfície branco-amarelada, sem distinção entre a cortical e medular. Massas tumorais com o mesmo aspecto podem ser encontradas no coração, rins, intestinos, abomaso, medula espinhal e útero. Histologicamente observa-se proliferação das células da linhagem linfocítica e infiltração maciça dessas células nos órgãos afetados.

5.1.3 Diagnóstico

Duas condições distintas devem ser consideradas no diagnóstico do BLV: o diagnóstico da enfermidade (leucose ou linfossarcoma) e o diagnóstico da infecção. A suspeita da doença clínica,

pela observação dos sinais mencionados, deve ser confirmada por exames histopatológicos e sorológicos; a infecção pode ser diagnosticada por testes sorológicos.

Dentre os sinais que mais chamam a atenção e levam o veterinário a suspeitar de leucose bovina, estão o infartamento de linfonodos superficiais, distúrbios digestivos persistentes com anorexia e perda de peso, presença de massas tumorais no intestino e paralisia dos membros posteriores. Como nenhum desses sinais é patognomônico, o diagnóstico requer a realização de testes sorológicos e/ou histopatológicos. Os testes sorológicos são realizados principalmente para a identificação de portadores e para triagem de rebanhos. Em animais com suspeita clínica, um teste sorológico positivo reforça a hipótese diagnóstica, mas não é capaz de fornecer o resultado definitivo. O diagnóstico definitivo de linfossarcoma no animal vivo pode ser obtido por exames histopatológicos de linfonodos superficiais obtidos por biópsia. No animal morto, os achados patológicos macro e microscópicos podem confirmar o diagnóstico.

Os testes sorológicos são utilizados para detectar a condição de portador. O primeiro teste sorológico empregado para diagnóstico da infecção pelo BLV foi a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), utilizando a proteína do capsídeo (p24) como antígeno. O uso da glicoproteína principal do envelope (gp51), entretanto, permitiu o aumento da sensibilidade desse teste. Desta forma, os testes de IDGA atuais utilizam a glicoproteína gp51 ou uma combinação de gp51 e p24 como antígeno. A simplicidade, praticidade e custo baixo fizeram com que o teste de IDGA fosse aceito rapidamente em todo o mundo, tornando-se o teste oficial para detecção de anticorpos anti-BLV.

Como os animais infectados pelo BLV permanecem como portadores permanentes, todos os animais positivos, com idade superior a seis meses, devem ser considerados portadores e potenciais fontes de infecção para outros animais.

A imunidade passiva pode influenciar as provas sorológicas para o BLV, gerando resultados falso-positivos. Sorologia positiva em animais com idade inferior a seis meses pode ocorrer em razão da infecção ou dos anticorpos maternos ad-

quiridos passivamente pelo colostro. Os anticorpos passivos tendem a desaparecer até os 6 ou 7 meses de idade, e o teste de IDGA nesses animais deve tornar-se negativo após este período. Resultados falso-negativos também podem ocorrer, sobretudo, em fêmeas prenhes nas proximidades do parto, devido ao seqüestro de anticorpos para o colostro. O ensaio imunoenzimático (ELISA) também tem sido utilizado para detecção de anticorpos anti-BLV e apresenta vantagens como a maior sensibilidade e facilidade de automação.

Apesar de apresentar uma grande variação de resultados entre diferentes laboratórios, o teste da reação em cadeia da polimerase (PCR), que detecta o DNA proviral, tem se mostrado útil como método complementar aos testes de IDGA e ELISA. Essa variação de resultados ocorre em função da variabilidade genética do genoma viral. O teste de PCR é realizado com DNA extraído de leucócitos em amostras de sangue coletadas com anticoagulante. Amostras negativas no IDGA ou no ELISA ou de animais que receberam colostro de mães positivas podem ser testadas por PCR. A técnica de PCR, no entanto, não é muito utilizada na rotina e possui aplicação apenas em situações especiais.

5.1.4 Profilaxia e controle

Considerando-se as formas de transmissão do BLV, é possível erradicar a infecção de rebanhos e populações maiores pela adoção de práticas de manejo associadas com o uso de medidas sanitárias profiláticas. A etapa inicial do programa envolve a realização de testes sorológicos e a identificação dos animais soropositivos. Os animais positivos devem ser preferencialmente descartados, mas podem ser mantidos no rebanho desde que separados dos demais e submetidos a práticas que minimizem o risco de transmissão. Os animais positivos devem ser distinguidos dos outros para serem facilmente reconhecidos e, assim, manejados com cuidados especiais para evitar a transmissão iatrogênica do vírus. Bezerros nascidos de mães positivas devem ser isolados e testados, só podendo ser introduzidos no rebanho negativo se mantiverem a condição soronegativa até os 6-8 meses, ocasião do desaparecimento dos

anticorpos passivos. A condição sorológica dos animais deve ser monitorada a cada seis meses, com a qual se avalia a eficácia das medidas adotadas.

Como medidas de controle em rebanhos que possuem animais positivos, citam-se:

- utilização de agulhas estéreis individuais para procedimentos profiláticos, clínicos e terapêuticos (aplicação de vacinas, antiparasitários, outros medicamentos, anestésicos e coleta de sangue);

- utilização de luvas de palpação individuais para cada animal;

- lavagem e desinfecção de instrumentos cirúrgicos ou de procedimentos potencialmente contaminados com sangue de animal infectado;

- adoção de um programa de controle de insetos hematófagos nas regiões em que há necessidade;

- uso de inseminação artificial, evitando transmissão de linfócitos infectados através da monta natural;

- separação dos bezerros filhos de mães positivas, não permitindo que entrem em contato com animais negativos até que sua condição sorológica para BLV possa ser definida. Pode-se coletar uma amostra de sangue do animal logo após o nascimento, antes de mamar o colostro. Caso a amostra seja positiva, considera-se que o animal foi infectado *in utero* e é portador do vírus;

- separação dos animais em grupos de positivos e negativos, o que favorece o manejo, pois os animais negativos devem ser manejados antes.

As propriedades livres do vírus devem adotar medidas para evitar a sua introdução. Para isso, todos os animais adquiridos devem ser previamente testados para o BLV. Se oriundos de rebanhos sabidamente negativos, podem ser incorporados ao rebanho; se oriundos de propriedades de situação sorológica desconhecida, devem ser mantidos separados por oito semanas e, então, submetidos a um novo teste sorológico.

A adoção de medidas de controle para evitar a disseminação do vírus dentro do rebanho tem surtido efeito e tem sido possível manter animais positivos no rebanho, com risco mínimo de transmissão aos outros animais. Essa estratégia somente deve ser adotada quando os animais

positivos possuem um alto valor genético e econômico; do contrário, devem ser identificados e eliminados do rebanho.

Atualmente não existem vacinas disponíveis contra o BLV.

5.2 Vírus da imunodeficiência bovina

O BIV (*bovine immunodeficiency virus*) foi isolado, pela primeira vez, por Van der Maaten e colaboradores, em 1972, a partir de um bovino com suspeita de linfossarcoma. Durante aproximadamente 15 anos, pouca importância foi dada ao BIV, pois esse vírus aparentemente não estava relacionado com nenhuma enfermidade. Com a descoberta de que a síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) era causada por um lentivírus, o BIV e outros vírus pertencentes a este gênero assumiram grande importância em estudos de evolução e de características biológicas e moleculares. O BIV foi classificado como um lentivírus por possuir similaridades moleculares, genéticas, antigênicas e estruturais com o HIV.

5.2.1 Epidemiologia

A presença do BIV já foi relatada em vários países, como o Canadá, Costa Rica, Estados Unidos, França e Itália. Nos Estados Unidos, a soroprevalência da infecção é bastante variável. Alguns estudos identificaram uma prevalência de anticorpos em 40% de animais de carne e em 60% de animais de leite no estado da Louisiana. Embora os dados de prevalência sejam escassos, acredita-se que o BIV esteja amplamente difundido na população bovina de diferentes países. No Brasil, von Groll et al. (1997) relataram, pela primeira vez, a presença do BIV pela detecção de animais sorologicamente positivos entre animais clinicamente saudáveis.

A transmissão experimental pode ser obtida pela administração de sangue total de um animal infectado. Dessa forma, o uso de agulhas e instrumental cirúrgico contaminados, ingestão de colostro de fêmeas infectadas e a higienização deficiente de instrumentos utilizados em práticas invasivas, como castrações e descornas, podem estar envolvidos na transmissão do BIV. Já foi de-

monstrada a presença do provírus do BIV em um grande número de amostras de sêmen, podendo essa secreção se constituir em um veículo para a transmissão. A transmissão pela via transplacentária também já foi demonstrada experimentalmente.

O BIV infecta naturalmente os bovinos e pode infectar experimentalmente ovinos, caprinos e coelhos.

5.2.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

Ainda não foi demonstrado que o BIV seja capaz de, agindo isoladamente, produzir manifestações clínico-patológicas específicas, nem que o vírus torne os animais infectados susceptíveis a outros agentes infecciosos. No entanto, existe uma correlação positiva entre soropositividade para o vírus (e a condição de portador) e redução na produção de leite.

Uma das primeiras descrições da infecção pelo BIV relata um bovino da raça holandesa, de oito anos, com um aumento no número de leucócitos e perda de condição corporal. Após a morte desse animal, não foram observados tumores, como inicialmente suspeito. Histologicamente foi relatada uma hiperplasia folicular dos linfonodos e lesões no sistema nervoso central.

Assim como outros lentivírus, o BIV apresenta tropismo por subpopulações específicas de leucócitos. Já foi identificada a presença de DNA proviral do BIV e a produção de partículas infecciosas em células B, T e em monócitos durante os estágios agudos da infecção.

O BIV pode ser propagado em vários tipos de cultivos celulares de origem bovina, e a replicação em células de baço e pulmão é mais indicada, pois o vírus é capaz de replicar em altos títulos.

5.2.3 Diagnóstico e controle

O diagnóstico da infecção pelo BIV pode ser realizado pela detecção de anticorpos, com o uso de técnicas como imunofluorescência (IFA) e *Western blot*. Anticorpos para o BIV podem ser detectados pelo teste de IFA, três semanas após

a infecção, e persistem por mais de dois anos em animais inoculados experimentalmente.

Pela prova de *Western blot*, anticorpos contra a proteína do capsídeo p26 são os primeiros a serem detectados, demonstrando que esta proteína é imunodominante.

A detecção do provírus e do RNA genômico, em células infectadas, pode ser realizada pelo uso das técnicas de PCR e transcrição reversa seguida de PCR(RT-PCR), respectivamente.

Considerando-se que o vírus infecta leucócitos, a medida mais indicada para prevenir a transmissão é evitar a transferência de sangue de animais contaminados para animais sadios. Além disso, é recomendado aquecer (56°C – 30 min) o leite de vacas soropositivas antes de fornecê-lo aos bezerros.

5.3 Vírus da pneumonia progressiva dos ovinos (Maedi-Visna)

O vírus Maedi-Visna (MVV) ou vírus da pneumonia progressiva dos ovinos (OPPV) foi caracterizado nos anos 1960, na Islândia, em ovinos que apresentavam pneumonia progressiva e encefalite degenerativa. A presença da doença havia sido descrita inicialmente nos anos 1930, quando mais de 100.000 animais morreram em decorrência da infecção. Os termos islandeses Maedi e Visna correspondem, respectivamente, aos sinais clínicos observados nos animais doentes: dispnéia e definhamento. A denominação *doenças causadas por vírus lentos* (*slow virus diseases*) foi atribuída, pela primeira vez, por Sigurdsson (1954), que identificou a presença de um agente viral associado a casos de Maedi-Visna.

O agente da Maedi-Visna é classificado no gênero *Lentivirus* e tem sido denominado, juntamente com o vírus da artrite-encefalite caprina, como lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV – *small ruminant lentivirus*) em função da similaridade genômica, antigênica e de apresentação da doença em caprinos e ovinos.

5.3.1 Epidemiologia

Com exceção da Islândia, de onde a doença foi erradicada após o sacrifício de milhares

de animais, a presença do MVV já foi detectada em diversos países da Europa e das Américas. A Austrália e Nova Zelândia são consideradas livres da doença. No Brasil, a situação epidemiológica da enfermidade é desconhecida, no entanto, já foram realizados alguns estudos e o seqüenciamento e análise filogenética de pelo menos um isolado do Sul do país.

O MVV foi, inicialmente, associado com infecção de ovinos, embora, atualmente, se aceite que possa ocorrer infecção cruzada entre ovinos e caprinos. Diversos estudos filogenéticos indicam para essa disseminação interespecíes, principalmente em países em que as duas espécies são criadas juntas.

O vírus é excretado em secreções como partículas livres ou associado com células como os monócitos e macrófagos. A transmissão pode ocorrer por contato direto ou indireto e através de materiais e equipamentos compartilhados. Para o recém-nascido, a principal fonte de contaminação é o colostro. O leite contaminado também pode permitir propagação do vírus entre animais que compartilhem o uso de ordenhadeiras e na prática de se utilizar um banco de colostro. Parece que a maioria das infecções ocorre pela ingestão de colostro ou leite de fêmeas soropositivas. O contato prolongado entre animais parece ser menos eficiente na transmissão do agente.

Considerando-se o comprometimento do trato respiratório, uma vez que o pulmão é o principal órgão de replicação do MVV, os aerossóis podem ser importantes na disseminação do vírus. A transmissão horizontal é favorecida em animais criados em regime de confinamento.

A transmissão intra-uterina não foi demonstrada claramente e, mesmo que ela ocorra, não parece desempenhar um papel epidemiológico importante. O mesmo se aplica à transmissão pelo sêmen contaminado.

5.3.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

As doenças associadas aos lentivírus apresentam uma evolução lenta e progressiva, caracterizadas por um longo período de incubação até o aparecimento dos sinais clínicos. Na maioria

das vezes, os animais desenvolvem uma resposta humoral com títulos de anticorpos detectáveis por testes sorológicos, mas que não resultam na erradicação do vírus do organismo. A exemplo dos outros retrovírus, uma vez infectado, o animal torna-se portador e fonte de contaminação para o rebanho durante toda a sua vida.

Vários fatores são responsáveis pela persistência do vírus no organismo do hospedeiro. No caso dos SRLV, foi demonstrada a importância da diferenciação/ativação dos macrófagos no incremento da produção de partículas virais. A restrição da replicação viral estaria relacionada com a ausência e/ou quantidades insuficientes de fatores de transcrição, capazes de levar à síntese dos mRNA virais codificadores das proteínas estruturais do vírion.

As patologias pulmonares estão associadas com a formação de folículos linfóides que, através da secreção de citocinas, contribuiriam para o desenvolvimento da pneumonia intersticial devido a uma resposta inflamatória exacerbada. Além do pulmão, a glândula mamária pode igualmente apresentar a formação de folículos linfóides e o conseqüente desenvolvimento de mastite. As manifestações de origem neurológica, por encefalite, são raras e foram descritas principalmente na epidemia que atingiu a Islândia e que levou à morte um grande número de animais. Comprometimentos articulares (artrites) foram igualmente descritos, mas com menor freqüência do que os quadros respiratórios.

Em função dos diferentes órgãos atingidos pelo vírus, as manifestações clínicas podem variar desde dificuldade respiratória, mastite acompanhada de endurecimento da glândula mamária, artrite, ataxia dos membros posteriores e incoordenação. Os sinais clínicos podem levar meses ou anos para se manifestarem; e apenas uma parcela dos animais infectados desenvolve a sintomatologia. Estima-se que apenas 30% dos animais sorologicamente positivos manifestem sinais clínicos da infecção, e as manifestações respiratórias apresentam maior incidência.

5.3.3 Diagnóstico e controle

Em regiões endêmicas, o diagnóstico presuntivo pode ser realizado pelo quadro clínico, embora apenas uma parcela dos animais apre-

sente sinais clínicos. As principais manifestações clínicas em ovinos infectados pelo MVV são os sinais respiratórios. O quadro pode progredir, levando à caquexia e morte. As fêmeas podem igualmente apresentar endurecimento do úbere devido à formação de nódulos linfóides. A suspeita clínica deve ser necessariamente confirmada por exames laboratoriais para a detecção de anticorpos ou de antígenos e RNA viral. O controle é principalmente baseado na identificação e segregação dos animais infectados.

Diversos testes sorológicos são utilizados para identificar os animais infectados, como a IDGA, ELISA, *Western blot* e radioimunoprecipitação (RIP). Não existe, atualmente, um teste que seja considerado padrão (*gold standard*) para determinar a sensibilidade e especificidade dos testes disponíveis. No entanto, é de consenso que a utilização de um teste sorológico associado a medidas de controle permite reduzir a prevalência da infecção, reduzindo a disseminação do agente no rebanho.

O isolamento viral é realizado a partir de co-cultivo de monócitos do sangue periférico ou de macrófagos alveolares com fibroblastos de origem fetal, células de plexo coróide ou mesmo com cultivos primários de membrana sinovial. Observa-se, na maioria das vezes, a formação de sincícios, caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas. A replicação do vírus em cultivo é lenta, e os resultados podem levar vários dias ou semanas.

As técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* podem ser utilizadas para demonstrar antígenos ou ácidos nucleicos virais nos cultivos e em amostras de tecidos destinadas à histopatologia. Ainda, para detecção do provírus ou do genoma viral, podem ser utilizadas a PCR e a RT-PCR.

A variabilidade genética e antigênica existente entre os isolados do SRLV indica que a detecção de anticorpos ou do ácido nucleico viral por PCR deve considerar as características das cepas circulantes na população estudada.

As principais medidas de controle relacionam-se com a identificação dos animais infectados e a sua separação dos não-infectados, pois não existem vacinas para os SRLV. Uma das me-

didias mais importantes consiste na separação do recém-nascido da fêmea infectada, impedindo a ingestão do colostro. Neste caso, pode-se proceder à inativação do vírus, aquecendo o colostro a 56°C por 1 hora ou fornecer colostro de origem bovina. A remoção gradativa de animais sorologicamente positivos associada com a reposição com animais negativos, separando-se os rebanhos positivos dos negativos, vem sendo utilizada em diversos países. O que determina o sucesso dos programas de controle é, em grande parte, a escolha do teste diagnóstico mais adequado à região, levando-se em consideração as cepas circulantes. Testes mais sensíveis que o IDGA devem ser adotados quando a prevalência de animais soropositivos diminui no rebanho.

5.4 Vírus da artrite-encefalite caprina

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) foi descrito, pela primeira vez, em 1980, por Crawford e colaboradores, como sendo um retrovírus causador de artrite, embora a etiologia viral de encefalite em caprinos jovens já tenha sido descrita anos antes por Cork (1974). Das duas manifestações clínicas inicialmente descritas, a artrite é a forma mais comum de apresentação da doença.

A classificação do CAEV é a mesma do MVV, assim como diversos aspectos de patogenia e transmissão. Assim, somente os aspectos que diferenciam os dois vírus serão abordados com maior ênfase, a seguir.

5.4.1 Epidemiologia

O vírus já foi detectado em diversos países, inclusive no Brasil, pelo isolamento do agente ou pela detecção de anticorpos. A infecção já foi detectada em caprinos nos estados de Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo. Um inquérito sorológico, no Ceará, demonstrou 1% de prevalência entre 4.019 animais e, no Rio de Janeiro, 32,1% dos rebanhos testados possuíam animais positivos.

O CAEV é transmitido principalmente através do colostro e leite, durante as primeiras mamadas dos recém-nascidos. A transmissão por sangue contaminado, pelo uso de agulhas hipo-

dérmicas e de material cirúrgico contaminado, além de feridas abertas, é considerada a segunda principal forma de transmissão. A transmissão por contato entre animais adultos é considerada pouco importante.

5.4.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

A patologia mais freqüente é a artrite, que se desenvolve lentamente e acomete geralmente animais adultos, com mais de dois anos de idade. A artrite afeta principalmente as articulações do carpo (joelhos), determinando um aumento de volume localizado, o que determinou a terminologia *big knee* (joelho grande). Os animais afetados apresentam dificuldade de locomoção e perda de peso.

A inflamação crônica das articulações parece ser mediada por deposição de imunocomplexos (complexos antígeno-anticorpos), pois foi evidenciada uma relação direta entre o título de anticorpos contra a proteína do envelope viral e a severidade das lesões articulares. Quanto maior o título de anticorpos no soro e/ou no líquido sinovial, mais abundantes e severas são as lesões.

A encefalite tem sido descrita principalmente em animais com idade inferior a seis meses, embora animais adultos também possam ser alvos da forma neurológica. Observa-se uma desmielinização, aumento no número de leucócitos no líquido céfalo-raquidiano, infiltração de células mononucleares e astrocitose na medula e no cérebro.

Alterações na glândula mamária e pneumonia intersticial também são manifestações da infecção pelo CAEV. Observa-se o endurecimento da glândula mamária, provavelmente associado com a formação de folículos linfóides, sendo denominada em inglês *hard udder* (úbere duro). Na pneumonia intersticial, observa-se uma proliferação de pneumócitos do tipo II e uma epiteliação dos alvéolos.

Assim como no caso do MVV, a presença de anticorpos não significa uma resposta imune protetora. A resposta imune humoral em caprinos infectados pode ser detectada tardiamente após a infecção, e a presença de anticorpos no teste de

ELISA pode ocorrer de forma intermitente durante a vida do animal. Além disso, já foi demonstrada a resistência à doença em animais portadores de certos haplótipos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).

A doença se manifesta principalmente em rebanhos com alta soroprevalência, sendo pouco significativa em rebanhos com baixa prevalência de animais soropositivos. Essa observação favorece a hipótese de que não existiriam fatores de virulência relacionados às cepas de SRLV, uma vez que se consegue eliminar a ocorrência da doença com a redução dos animais soropositivos no rebanho.

5.4.3 Diagnóstico e controle

Os métodos de diagnóstico e as medidas de controle são basicamente as mesmas preconizadas para os ovinos infectados pelo MVV.

Além dos testes sorológicos descritos para o MVV (IDGA, ELISA, *Western blot*) pode-se usar também a IFA indireta para detecção de anticorpos. Nesses testes, células infectadas com o vírus servem de antígeno para a captura dos anticorpos no soro-teste. Os antígenos dos testes sorológicos podem ser empregados indiscriminadamente para os SRLV. No entanto, alguns trabalhos demonstraram que o uso de antígenos de CAEV para detecção de anticorpos em caprinos aumenta a sensibilidade do teste quando comparado com antígenos de MVV.

O resultado positivo no teste sorológico indica que o animal é portador do CAEV e pode transmitir o agente a outros animais, principalmente durante a lactação através do colostro. A ausência de sinais clínicos é irrelevante do ponto de vista de controle, pois acima de 90% dos animais portadores podem não apresentar manifestações clínicas. Se o teste for realizado em animais com idade inferior a seis meses, é possível que o resultado positivo se deva a anticorpos maternos adquiridos pelo colostro. Nesses casos, recomenda-se avaliar o animal novamente após os seis meses de idade. Nesse período, devem-se minimizar as chances de transmissão do agente a partir desse animal, que deve ser considerado suspeito.

Um aspecto importante a salientar é o fato de que, em função das evidências de infecção cruzada entre ovinos e caprinos, as medidas de controle a serem implementadas em uma propriedade ou região devem considerar as duas espécies. No entanto, na Austrália e na Nova Zelândia, foi demonstrada somente a ocorrência de infecção por CAEV em caprinos, sem evidências de infecção por lentivírus em ovinos.

5.5 Vírus da adenomatose pulmonar dos ovinos

A adenomatose pulmonar dos ovinos (SPA, para *sheep pulmonary adenomatosis*) é causada pelo retrovírus de ovinos Jaagsiekte (JSRV), pertencente ao gênero *Betaretrovirus*. A denominação Jaagsiekte foi atribuída na primeira descrição do vírus, na África do Sul, em 1825. A palavra *Jaagsiekte*, de origem holandesa, foi proferida por um fazendeiro para se referir a duas manifestações observadas em ovinos afetados: *jaag* significa caçar, e *siekte* significa doença. Os animais doentes apresentavam-se como se tivessem sido perseguidos ou caçados, devido à dificuldade respiratória. Outra denominação da doença é carcinoma pulmonar de ovinos (OPC, para *ovine pulmonary carcinoma*), sendo considerada como modelo para o carcinoma brônquio-alveolar de humanos pelas semelhanças clínicas, macroscópicas e histopatológicas dos dois tumores.

5.5.1 Epidemiologia

O JSRV apresenta distribuição mundial, com exceção da Austrália, onde a doença ainda não foi descrita, e da Islândia, de onde a doença foi erradicada. A doença ocorre de forma esporádica, podendo atingir até 25% de incidência em alguns rebanhos de alto risco em países como o Reino Unido, África do Sul e Espanha. A doença também já foi descrita no Chile, no Peru e no Brasil, onde é considerada enfermidade de notificação obrigatória.

No genoma dos ovinos, estima-se que existam entre 15 e 20 cópias do genoma de retrovírus endógenos relacionados ao JSRV, alguns deles apresentando transcrição ativa. No entanto, foi

demonstrado que o JSRV, produzido a partir de um clone infeccioso, foi capaz de reproduzir a doença.

A transmissão, embora ainda não totalmente elucidada, parece ocorrer através de contato direto e indireto com secreções do trato respiratório e também pela saliva. Os animais infectados provavelmente excretam o vírus em secreções respiratórias mesmo alguns dias antes do início dos sinais clínicos. As secreções podem formar aerossóis e aumentar o alcance da disseminação.

Tem sido demonstrado que os caprinos podem se infectar naturalmente pelo JSRV, com frequência semelhante aos ovinos. O significado epidemiológico e patológico desses achados, no entanto, são desconhecidos.

5.5.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

Os animais infectados apresentam uma infecção silenciosa, aparentemente sem a indução de resposta imune humoral. Níveis baixos de RNA e DNA proviral estão presentes, e podem ser detectados pelo uso de técnicas de detecção de ácidos nucleicos altamente sensíveis, como a *nested* PCR. As células envolvidas na disseminação do vírus no organismo do hospedeiro seriam principalmente as da linhagem linfóide, como os linfócitos B, e da linhagem mielóide, como monócitos e macrófagos. A formação dos tumores está relacionada com a transformação neoplásica de células epiteliais do pulmão. O vírus replica ativamente nas células epiteliais tumorais, originadas a partir dos pneumócitos tipo II e das células clava bronquiolares. Antígenos virais podem ser detectados nas células tumorais, embora o mecanismo de transformação neoplásica pelo vírus ainda não seja conhecido. Os tumores associados com a infecção são classificados como adenomas e adenocarcinomas. Recentemente, foi demonstrada a capacidade da proteína do envelope viral em induzir a transformação em diferentes tipos celulares, e a formação de tumores em camundongos e ovinos recém-nascidos.

O período até a manifestação de sinais clínicos pode variar de um a três anos, sendo mais curto em animais jovens. A sintomatologia clínica

está relacionada com a produção de muco pelas células tumorais, observando-se tosse e descargas nasais abundantes. Pode ocorrer a obstrução das vias respiratórias e morte por anoxia e pneumonia por infecções secundárias.

5.5.3 Diagnóstico e controle

Devido à ausência de resposta humoral detectável, o diagnóstico da infecção deve basear-se principalmente nos sinais clínicos nas fases avançadas da doença. Nessa fase, freqüentemente observa-se secreção nasal abundante, acompanhada de dispnéia em graus variáveis. Os achados macroscópicos e histopatológicos devem ser considerados para a confirmação da suspeita clínica.

A detecção de ácidos nucleicos virais nos tumores por hibridização *in situ* ou por PCR podem ser também utilizados.

Após a confirmação do diagnóstico, o controle da infecção pode ser estabelecido pelo isolamento dos animais doentes, reduzindo a incidência da doença no rebanho. Em alguns países, o descarte dos animais positivos (e erradicação dos animais do rebanho) é a medida indicada.

5.6 Vírus da anemia infecciosa eqüina

A anemia infecciosa eqüina (EIA) é uma doença infecciosa potencialmente fatal que afeta os eqüídeos. O EIAV (*equine infectious anemia virus*) é mais um membro do gênero *Lentivirus*. Assim como os SRLV, o EIAV também apresenta algumas características que o relacionam ao HIV. Foram reações sorológicas cruzadas, observadas entre o soro de eqüinos infectados e a proteína do capsídeo do HIV, que levaram Montagnier e colaboradores a relacionar o vírus que havia sido recentemente isolado com os lentivírus. A anemia infecciosa eqüina foi inicialmente descrita em 1843, na França, e sua etiologia viral foi determinada em 1904, por Vallée e Carré. A enfermidade é facilmente confundível com outras infecções que cursem com febre, como a influenza e as encefalites eqüinas.

5.6.1 Epidemiologia

A infecção pelo EIAV apresenta distribuição mundial, com maior ocorrência em áreas tropicais ou subtropicais pantanosas e que apresentem populações numerosas de vetores artrópodes – moscas, tabanídeos e mosquitos. Em áreas endêmicas, a prevalência pode atingir 70% dos animais adultos. Estudos sorológicos em vários estados brasileiros, como o Pará, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Rio Grande do Sul, demonstram a presença do EIAV na população eqüina do país. Em geral, os níveis de prevalência são moderados a altos em regiões com populações numerosas e permanentes dos insetos vetores.

Os hospedeiros naturais são os eqüídeos e, até o presente, não foi demonstrada infecção natural de outras espécies. A principal forma de transmissão é pela picada de insetos hematófagos – sobretudo tabanídeos – que exercem o papel de vetores mecânicos, carreando o vírus na probóscide. A transmissão é mais freqüente em áreas de grande infestação de insetos e com grande concentração de animais. A picada dos insetos estimula um reflexo defensivo dos animais, o que freqüentemente resulta na interrupção do repasto sangüíneo. Esses insetos procuram reiniciar o repasto com a maior brevidade, freqüentemente o fazendo em animais que se encontram nas proximidades e, com isso, transmitindo o agente. A transmissão do EIAV por insetos depende da população e hábitos dos insetos, da densidade dos animais, do número de picadas no animal e em animais das proximidades, da quantidade de sangue transferida entre animais, e do nível de vírus no sangue do animal infectado que serve de fonte de infecção. Mosquitos e moscas também podem transmitir a infecção entre animais.

Acredita-se que o homem também possa desempenhar um papel epidemiológico na transmissão do EIAV entre animais, pela utilização de agulhas, seringas e materiais cirúrgicos não-descartáveis. Embora possua papel epidemiológico secundário, a transmissão pela ingestão de leite ou pela inseminação artificial com o sêmen contaminado também pode ocorrer.

5.6.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

O curso clínico da infecção é variável e está relacionado com a susceptibilidade do hospedeiro, dose e virulência da cepa do EIAV envolvida. Nos dias que se seguem à infecção, os animais desenvolvem uma viremia inicial, que cursa com hipertermia, anemia e trombocitopenia. Essas manifestações são geralmente observadas entre uma a duas semanas após infecção, e estão relacionadas com a resposta imunológica. A anemia é resultante de hemólise e fagocitose, mediada pela presença de eritrócitos recobertos pelas proteínas do complemento (C3) e, concomitantemente, pela redução da eritropoiese. A trombocitopenia parece estar associada com um aumento dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que é um regulador negativo da produção de plaquetas no plasma dos animais infectados. A hipertermia deve-se aos níveis aumentados de TNF- α e também pela produção de interleucina 1 (IL-1) por células da linhagem monocítica-macrofágica.

Acredita-se que a maioria dos animais infectados apresente uma infecção subclínica, tornando-se portadores assintomáticos do agente. Esses animais geralmente apresentam níveis mais baixos de viremia do que aqueles que desenvolvem a infecção ativa sintomática. A forma inaparente – ou subclínica – da infecção pode se transformar em forma clínica aguda ou crônica devido a fatores como estresse, trabalho pesado ou a ocorrência concomitante de outras doenças.

Em cavalos infectados experimentalmente, observa-se o estabelecimento de uma infecção persistente, geralmente acompanhada por episódios de viremia, febre e anemia. Além das manifestações supracitadas, os animais podem apresentar glomerulonefrite, linfadenopatia e infiltração de macrófagos e linfócitos no fígado e em outros órgãos. A exemplo dos outros retrovírus, a infecção pelo EIAV é persistente, ou seja, os animais infectados tornam-se portadores do agente por toda a vida. A diferença entre a infecção pelo EIAV daquelas causadas por outros lentivírus é o fato de o EIAV desencadear picos de viremia, que não são observados em infecções pelo CAEV, MVV ou FIV.

Após a viremia primária, diferentes quadros podem se desenvolver nos animais infectados pelo EIAV: a) anemia profunda e morte (forma aguda); b) recuperação e recidivas coincidentes com novas viremias (forma crônica) ou, ainda, c) o animal pode tornar-se um portador, mas sem recidivas ou manifestações clínicas aparentes (forma inaparente). As recidivas e novas viremias estão associadas com o surgimento de variantes virais e, à medida que o sistema imune reage à infecção pela produção de anticorpos e pela resposta celular, ocorre redução da carga viral no sangue, correspondendo aos períodos assintomáticos.

Na forma crônica, os episódios de febre podem ocorrer a intervalos variáveis, entre os quais a temperatura volta a valores normais. Quadros recorrentes de depressão e letargia, petéquias nas mucosas, emagrecimento progressivo, edema nas partes baixas e anemia estão frequentemente associados com a infecção crônica.

A resposta mediada por linfócitos T citotóxicos específicos para epitopos das proteínas do capsídeo e das glicoproteínas do envelope viral seria a principal responsável pela manutenção do estado assintomático em animais portadores. O período entre uma recidiva e outra é variável, podendo ser inferior a 30 dias.

A replicação contínua do vírus nas células-alvo – os monócitos/macrófagos – é responsável pela carga viral presente na corrente sanguínea. Embora ocorra uma redução de até 700 vezes nos títulos virais no sangue de animais assintomáticos quando comparados com animais virêmicos, estima-se que a replicação viral continue nesses períodos, nos macrófagos de diferentes órgãos, como o fígado, linfonodos e baço.

5.6.3 Diagnóstico e controle

As manifestações clínicas de hipertermia, anemia, depressão e letargia recorrentes, em áreas endêmicas para o agente são sugestivas da infecção pelo EIAV e devem ser investigadas. A detecção de anticorpos é o método laboratorial mais empregado para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. O teste sorológico mais utilizado – e considerado o teste-padrão – é a IDGA, também

conhecido como teste de Coggins. Esse é o teste recomendado pelo Ministério da Agricultura de vários países. A suspeita clínica também pode ser confirmada por outros testes laboratoriais, como fixação do complemento, inibição da hemaglutinação (HI), IFA e ELISA.

O teste de IDGA se constitui em um teste simples, com boa especificidade (baixa sensibilidade), que pode ser utilizado para a confirmação da suspeita clínica, mas que possui aplicação mais importante no monitoramento de rebanhos e da condição sanitária de animais submetidos a transporte, comércio, importação/exportação. No Brasil, laboratórios e técnicos interessados em realizar o teste devem ser cadastrados no Ministério da Agricultura e ser submetidos a treinamento específico. Somente técnicos e laboratórios cadastrados são legalmente licenciados para a realização do teste e emissão do laudo.

O EIAV replica em macrófagos dos eqüinos infectados, mas o isolamento viral não é uma técnica empregada na rotina diagnóstica, embora existam cepas laboratoriais adaptadas em cultivo de fibroblastos. O vírus não induz efeito citopático, e a confirmação da infecção pode ser feita por IFA ou pela detecção de RNA viral ou DNA proviral por RT-PCR ou PCR, respectivamente.

Não existem vacinas comerciais disponíveis contra o EIAV. O controle da infecção baseia-se na identificação e restrição ao trânsito e comércio de animais positivos. Animais destinados a comércio, trânsito, participação em competições, feiras e exposições devem ser necessariamente testados e apresentar resultado negativo no teste de IDGA. No Brasil, os animais positivos nesse teste devem ser sacrificados, conforme estabelecido no Programa Nacional de Sanidade dos Eqüinos do Ministério da Agricultura.

Outras medidas de controle recomendadas são: a) isolamento dos animais positivos até o sacrifício; b) não compartilhar seringas e outros utensílios que possam ser veículo de células infectadas; c) combate a insetos vetores em áreas endêmicas (inviável em grandes áreas ou em áreas de grande infestação, mas viável em instalações); d) minimizar o contato de eqüinos com secreções, sangue ou outros eqüinos de *status* sanitário desconhecido, até que sejam testados e certificados livres do vírus.

5.7 Vírus da leucemia felina

O vírus da leucemia felina (FeLV) pertence ao gênero *Gamaretrovirus*, cujo protótipo é o vírus da leucemia murina (MLV). Dentre os gamaretrovírus de mamíferos, o FeLV se enquadra na categoria dos vírus autônomos para a replicação, enquanto os outros vírus do gênero são defectivos.

Embora ainda não tenham sido descritos sorotipos, os isolados do FeLV possuem variantes ou subgrupos (FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T), devido à variabilidade das seqüências de aminoácidos das glicoproteínas do envelope. As variações de seqüências detectadas na proteína SU seriam responsáveis pela utilização de diferentes receptores celulares, o que resultaria em diferenças de tropismo e patogenicia entre isolados de campo.

5.7.1 Epidemiologia

A infecção pelo FeLV possui distribuição mundial, e a sua prevalência é notadamente maior em locais de grande densidade de felinos, como os gatis e abrigos. Nesses locais, o contato freqüente e próximo entre os animais facilita a transmissão e pode resultar em prevalências de até 33%. A prevalência é geralmente mais baixa, podendo atingir níveis aproximados de 1%, na população geral de gatos domésticos, em que o contato entre animais é apenas casual. No Brasil, a ocorrência da infecção tem sido demonstrada em felinos domésticos e selvagens em vários estudos. No zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 12 de 16 felinos selvagens possuíam antígenos do FeLV e, no Ceará, 83% dos gatos de rua testados foram positivos. Um estudo em São Paulo revelou uma prevalência baixa (<5%).

Acredita-se que a transmissão ocorra principalmente por contato direto e indireto, através da saliva, sendo favorecida durante as brigas. Isso pode explicar o porquê de gatos castrados apresentarem incidência menor da infecção. Os gatos com infecção persistente podem excretar até 10^6 vírions por mL de saliva, o que constitui a principal fonte de vírus para a transmissão por contato

direto ou por fômites. A utilização de seringas e outros equipamentos contaminados com sangue também podem transmitir o agente. Já foi descrita a transmissão vertical, inclusive de fêmeas apresentando a infecção latente.

5.7.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

A forma mais comum de apresentação clínica por animais infectados pelo FeLV é a imunodeficiência, causada principalmente por variantes do subgrupo A. Os vírus desse subgrupo são igualmente os mais descritos na transmissão natural, na qual se classifica o isolado FeLV-FAIDS. Além do quadro de imunodeficiência, outras manifestações estão associadas à infecção pelo FeLV: linfomas, leucemia, anemia e falhas reprodutivas.

Os sinais clínicos mais comuns são os observados em casos de imunodeficiência e devem-se a infecções oportunistas e repetidas: estomatite e gengivite crônicas, lesões de pele e abscessos subcutâneos, doenças respiratórias crônicas e maior incidência de peritonite infecciosa felina. A ocorrência de toxoplasmose também é favorecida pela infecção pelo FeLV.

A imunodeficiência está relacionada com a presença do antígeno viral – oncovírus felino associado à membrana (*feline oncovirus membrane-associated antigens*, FOCMA) – e ocorre por causa da depleção das células linfóides infectadas, provavelmente pela ação citotóxica mediada por anticorpos (ADCC). A leucemia e anemia são induzidas a partir da transformação de células-tronco, das linhagens mielóides e linfóides, que dão origem aos linfócitos e eritrócitos. Os variantes do subgrupo C, aparentemente gerados a partir de mutações de vírus do subgrupo A, parecem estar associados com os casos de anemia induzidos pelo FeLV.

Os linfossarcomas representam 30% dos tumores em felinos, e evidências indicam que a maioria deles está associada ao FeLV. Esses tumores podem se desenvolver em diferentes células e tecidos, como o timo, trato gastrintestinal, sistema nervoso, pele e outros.

O contato com o FeLV, na maioria dos gatos, leva a uma infecção aguda temporária que pode progredir para a recuperação clínica completa ou infecção latente. Em outras situações, pode ocorrer uma viremia persistente, que resulta no desenvolvimento da doença, nas suas diversas manifestações fatais. Os fatores que conferem resistência ou susceptibilidade não são totalmente conhecidos, embora tenha sido descrito que animais jovens sejam mais susceptíveis do que animais adultos. A exemplo dos outros retrovírus, a infecção pelo FeLV é essencialmente persistente.

Recentemente, analisando animais vacinados e não-vacinados desafiados experimentalmente, pesquisadores propuseram quatro categorias para definir as relações do FeLV com o hospedeiro: a) abortiva, em que não foi detectado DNA proviral, nem antígeno viral; b) regressiva, quando não é detectado antígeno viral e a carga proviral é transitória ou baixa; c) latente, antigenemia transitória e carga proviral moderada e d) progressiva, antigenemia e carga proviral elevadas e persistentes. As diferentes categorias observadas experimentalmente sugerem que alguns animais, naturalmente infectados, poderiam eliminar o vírus e não apresentariam nenhuma sintomatologia clínica. Por outro lado, animais com infecção latente poderiam não ser detectados através da antigenemia e seriam prováveis fontes de transmissão.

A detecção de anticorpos neutralizantes tem sido associada com a recuperação dos animais infectados. No entanto, o surgimento de anticorpos é posterior à erradicação do vírus em animais que desenvolvem uma infecção transitória, o que indicaria a existência de uma resposta imune do tipo celular.

5.7.3 Diagnóstico e controle

O isolamento do vírus não é muito utilizado como método diagnóstico, embora antígenos virais possam ser detectados em células do sangue periférico. Conseqüentemente, a técnica mais utilizada no diagnóstico é a IFA, em esfregaços sanguíneos, utilizando anticorpos específicos para as proteínas do capsídeo. Existem kits de ELISA e

testes imunocromatográficos disponíveis para a detecção de antígenos virais. Esses *kits* podem ser utilizados em clínicas e consultórios e permitem a obtenção do resultado em poucos minutos, porém possuem um custo relativamente alto.

Considerando os animais em que a presença do antígeno viral não seja detectada, técnicas moleculares de detecção do genoma viral e proviral (RT-PCR e PCR, respectivamente) podem ser necessárias. Na Suíça, um estudo demonstrou que 10% dos gatos eram portadores, detectados através da presença do provírus, embora não tenha sido possível detectar o antígeno viral. Recentemente foi descrita a utilização de RT-PCR e PCR para detecção de RNA viral e DNA proviral, respectivamente, na saliva de animais infectados.

O controle da infecção pode ser realizado a partir do diagnóstico correto e envolve necessariamente o isolamento dos animais positivos, evitando que transmitam o agente a outros animais. Vacinas preparadas com o vírus completo inativado obtido a partir de cultivos celulares são disponíveis comercialmente, assim como vacinas recombinantes contendo proteínas virais expressas em sistemas heterólogos. O uso das vacinas inativadas pode resultar em uma redução de 70% de incidência da doença nos animais imunizados. Alguns estudos indicam a necessidade de indução de uma resposta mediada por linfócitos Tc, como a induzida por vacinas de DNA, para a obtenção de uma imunidade realmente protetora.

A vacina para o FeLV foi a primeira a ser desenvolvida e utilizada na prevenção de uma doença causada por retrovírus em mamíferos. O fato de que algumas delas sejam capazes de proteger completamente o animal vacinado (infecção abortiva), sugere que alguns animais possam erradicar totalmente o vírus quando infectados naturalmente.

5.8 Vírus da imunodeficiência felina

O primeiro isolamento de imunodeficiência felina (FIV) foi descrito em 1986, na cidade de Petaluma, Estados Unidos. A presença do vírus estava associada com um quadro de imunodefi-

ciência, e as características ultra-estruturais das partículas víricas, assim como a detecção da atividade de transcriptase reversa, permitiram a sua classificação como um retrovírus pertencente ao gênero *Lentivirus*. Os isolados de campo do FIV são agrupados em cinco genótipos (A, B, C, D e E), com base em similaridade genética. Os genótipos A e C são mais frequentes na América do Norte, embora atualmente os genótipos A e B sejam os mais detectados em todo o mundo. Filogeneticamente o FIV é mais próximo dos lentivírus EIAV, CAEV e MVV do que dos lentivírus de primatas, como o HIV. Apesar disso, esse vírus é considerado um modelo animal adequado para estudos de patogenia, pesquisa de drogas anti-retrovirais e desenvolvimento de vacinas para o HIV. Isso se deve principalmente às características semelhantes dos quadros de imunossupressão observados em gatos (FIV) e humanos (HIV).

5.8.1 Epidemiologia

O FIV apresenta uma distribuição mundial e já foi isolado também de felinos selvagens, além de já terem sido descritos vários isolados de gatos domésticos. A soroprevalência na população geral pode variar de 1 a 30%, com índices mais elevados entre animais que apresentam sinais de doença. Em níveis mundiais, estima-se uma prevalência de aproximadamente 12% nos felinos domésticos. O FIV tem sido descrito em felinos no Brasil. No Rio de Janeiro, 21% dos felinos testados eram positivos para o vírus. No Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo, estudos epidemiológicos têm confirmado a presença da infecção em felinos com imunodeficiência ou sem sinais clínicos.

A infecção ocorre com maior frequência em gatos com mais de um ano de idade. A principal forma de transmissão parece ser pelo contato direto, através da saliva, pelas mordidas durante as brigas entre animais. Os machos se infectam com o dobro da frequência das fêmeas, pelo seu comportamento social e agressivo distinto. O vírus também pode ser transmitido pelo sêmen durante a cópula e pelo leite de fêmeas infectadas (infecção pela via oral).

5.8.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

A imunossupressão observada nos animais infectados pelo FIV é o resultado da depleção dos linfócitos T auxiliares (CD4⁺), que leva a uma inversão da relação CD4⁺/CD8⁺. O comprometimento do sistema imunológico resulta no desenvolvimento de infecções oportunistas, que caracterizam os estágios finais da doença (Tabela 31.3).

A disseminação do vírus no organismo do hospedeiro ocorre principalmente pelos linfócitos infectados e, em menor escala, pelos monócitos e macrófagos. Estes últimos estariam relacionados com a persistência do vírus nos estágios finais da doença.

O vírus pode ser detectado em órgãos linfóides, nos pulmões, fígado, rins e no plexo coróide. Os achados histopatológicos associados com a enfermidade consistem de hiperplasias no tecido linfóide associados às mucosas (MALT), nos linfonodos, tonsilas, timo e medula óssea.

A presença de anticorpos contra o FIV pode ser evidenciada por testes sorológicos em duas a quatro semanas após a infecção. Os machos adultos têm sido apontados como a categoria animal

de maior incidência da infecção, provavelmente devido aos fatores de risco para a transmissão do agente (agressividade, brigas, contato com vários animais).

5.8.3 Diagnóstico

A sintomatologia clínica observada em gatos infectados pelo FIV é inespecífica e reflete um quadro geral de imunossupressão, semelhante ao observado na leucemia pelo FeLV. Quadros sugestivos de imunossupressão devem ser investigados para a presença de anticorpos, antígenos ou ácidos nucléicos virais.

Para a detecção de anticorpos, os testes mais utilizados são o ELISA, IFA e o Western blot. Animais com testes negativos devem ser testados novamente após 60 dias, para a confirmação do resultado. Existem *kits* baseados em cromatografia para o diagnóstico da infecção em nível ambulatorial, pela detecção de antígenos virais no sangue total. A detecção do provírus em células sangüíneas por PCR também pode ser realizada, utilizando-se o DNA extraído dos leucócitos. Essa técnica tem se difundido nos últimos anos e se constitui em uma importante ferramenta para a identificação de animais infectados. Porém, a

Tabela 31.3. Manifestações clínicas e estágios da infecção pelo FIV.

Forma	Manifestações clínicas	Duração
Infecção aguda	Nenhuma ou inespecífica (febre, linfadenopatia, diarreia, infecções respiratórias)	Semanas ou meses
Portador subclínico	Nenhuma	Anos
Linfadenopatia generalizada	Aumento generalizado dos linfonodos, sinais inespecíficos (febre, anorexia, perda de peso), alterações comportamentais	Anos
ARC (<i>AIDS related complex</i>)	Linfadenopatia, infecções crônicas secundárias (na cavidade oral e trato respiratório superior)	Meses a anos
FAIDS (AIDS felina)	Infecções crônicas oportunistas e secundárias severas, tumores e emaciação	Meses

^a Fonte: adaptado de Ishida e Tomoda (1990).

utilização da técnica de PCR para o diagnóstico da infecção pelo FIV tem sido questionada, pela falha na detecção de vírus com variações genômicas.

5.8.4 Controle e profilaxia

Após a identificação dos animais positivos, o controle pode ser realizado pela sua separação dos demais animais, reduzindo a possibilidade de transmissão. Animais que tem acesso às ruas, e que, portanto, entram em contato com outros animais, apresentam uma probabilidade maior de serem infectados. A limitação do acesso de gatos domésticos às ruas pode reduzir o risco de adquirirem a infecção, mas isto nem sempre é exequível.

Diversas vacinas experimentais têm sido desenvolvidas e avaliadas, incluindo vacinas com vírus inativado, proteínas recombinantes e vacinas de DNA. De uma maneira geral, a diversidade genética e antigênica dos isolados de campo tem dificultado o sucesso e a utilização das vacinas em larga escala. Vacinas inativadas têm demonstrado maior eficiência em triagens vacinais. Uma vacina que contém dois genótipos do FIV e protege contra um terceiro genótipo foi licenciada nos EUA e é atualmente comercializada. No entanto, a sua eficácia em limitar a transmissão natural do vírus na população felina necessita de comprovação.

Alguns estudos têm demonstrado resultados promissores com a utilização de interferon recombinante para o tratamento da infecção, aumentando a sobrevivência dos animais tratados. O tratamento de felinos infectados com o FIV e FeLV por cinco dias, com rFeIFNw (interferon omega recombinante felino), pela via subcutânea, aumentou duas vezes as chances de sobrevivência. Clínicos têm utilizado interferon- α humano para o tratamento de várias doenças virais felinas, relatando alguns sucessos na terapia. No entanto, ainda são necessários estudos para a comprovação da eficácia do interferon em espécie heteróloga. Drogas que estimulam o sistema imune, como a Immunoregulin®, também são utilizadas. Essa droga contém a *Propionibacterium acnes*, que ativa

macrófagos e estimula a produção de linfocinas e a resposta imune celular, aumentando a atividade das células NK. O AZT (Retrovir®), usado no tratamento da AIDS em humanos, também é utilizado em gatos com sinais clínicos de FIV.

5.9 Vírus da leucose aviária

Descrito, pela primeira vez, em 1908, o vírus da leucose aviária (ALV) é um *Alpharetrovirus* causador de displasias e neoplasias do sistema hematopoiético em aves. O termo refere-se às manifestações clínicas do vírus, como a leucemia, caracterizada pela presença de linfócitos B imaturos na corrente sanguínea, e a invasão de órgãos periféricos como o baço, fígado, rins e sistema nervoso por essas células.

Aspectos relacionados ao espectro de hospedeiros susceptíveis (presença de receptores), neutralização viral por anti-soro específico e interferência viral foram utilizados para classificar o vírus da leucose aviária em vários subgrupos. Os ALV são divididos em grupos endógenos presentes no genoma das galinhas (subgrupo E) e grupos exógenos (subgrupos A, B, C, D e J). A maioria dos surtos de leucose aviária tem sido atribuída aos subgrupos A, B e J. O subgrupo J tem sido identificado como o principal agente causal de tumores em frangos de corte e é também o grupo de vírus que atinge o maior número de linhagens de galinhas, uma vez que já foram descritas várias linhagens resistentes a um ou mais dos outros subgrupos.

5.9.1 Epidemiologia

O ALV está presente de forma endêmica em praticamente todos os países que possuem avicultura comercial. A incidência da infecção pode variar de 3 a 20%, com a ocorrência de surtos esporádicos. O subgrupo J já foi descrito como ocasionando perdas de até 30% em matrizes de corte.

A transmissão ocorre de duas formas principais: vertical e horizontal. A transmissão vertical pode ocorrer pela transferência congênita do vírus infeccioso e por transmissão genética, com

a integração do provírus DNA nos cromossomos dos gametas. Essas duas formas de transmissão vertical estão associadas com quadros clínicos diferentes. A primeira forma resulta no desenvolvimento de viremia e leucemia, enquanto a presença do provírus no gameta não induz viremia, e a infecção é geralmente latente. A transmissão horizontal pelo contato direto ou indireto com saliva contaminada pode desempenhar um papel importante na disseminação da infecção devido à alta densidade populacional em granjas industriais.

5.9.2 Patogenia, sinais clínicos, patologia e imunidade

A forma mais comum de apresentação de doença pelos animais infectados com ALV é a leucose, que acomete aves de 14 a 30 semanas de idade, sem o desenvolvimento de sinais clínicos específicos. As aves apresentam fraqueza, redução na ingestão de alimentos e pode haver a formação de tumores na bursa de Fabricius, baço, fígado e outros órgãos.

A infecção inicia-se na bursa de Fabricius, com a formação de folículos, aproximadamente um mês após a infecção, caracterizados por acúmulo de linfoblastos (pré-B). A maioria dos folículos regride, mas alguns poderão dar origem a nódulos neoplásicos que, em seis a oito meses, serão responsáveis por metástases no fígado e no baço. A transformação celular é decorrente da integração do provírus próximo a um proto-oncogene celular (*c-myc*).

Outras manifestações clínicas também associadas com a infecção pelo ALV são: osteopetrose, que atinge principalmente os membros inferiores, e anemia. Os sinais clínicos e lesões podem aparecer associados com a leucemia e tumores.

5.9.3 Diagnóstico e controle

O diagnóstico de leucose aviária é geralmente realizado por ocasião da necropsia, associando-se os achados tumorais com o histórico e sinais clínicos. No diagnóstico diferencial, deve-se considerar a doença de Marek.

Como testes laboratoriais a serem utilizados para o diagnóstico definitivo, podem ser citados:

a) o isolamento viral em ovos embrionados ou em cultivos celulares, b) teste de fixação do complemento para detecção da proteína do capsídeo em cultivo celular inoculado (teste de COFAL), c) ELISA, d) IFA e e) PCR para detecção do provírus, com capacidade de diferenciação entre os subtipos.

O controle baseia-se em medidas profiláticas para evitar a transmissão horizontal onde há alta densidade populacional (sistema *all-in-all-out*) e na escolha de linhagens resistentes, o que levou a uma diminuição significativa de infecção por ALV em granjas comerciais. Apesar da seleção de linhagens resistentes, o surgimento de mutantes e/ou recombinantes capazes de infectar essas linhagens tem sido descrito.

6 Bibliografia consultada

- BARON, T. et al. Detection of bovine immunodeficiency-like virus infection in experimentally infected calves. *Archives of Virology*, v.143, p.181-189, 1998.
- BENDINELLI, M. et al. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, p.87-112, 1995.
- BIENZLE, D. et al. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The Canadian Veterinarian Journal*, v.45, p.753-757, 2004.
- BRUNNER, M.A.; LEIN, D.H.; DUBOVI, E.J. Experiences with the New York State bovine leucosis virus eradication and certification program. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.13, p.143-150, 1997.
- CAMARGOS, M.F. et al. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.40, p.341-348, 2003.
- CANAL, C.W.; SILVA, E.N. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliose. In: BERCHIERI JÚNIOR, A; MACARI, M. *Doenças das Aves*. Campinas, SP: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000. Cap.5.1, p.255-265.
- CAXITO, F.A.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus: a review. *Virus Reviews and Research*, v.9, p.7-17, 2004.
- COFFIN, J.m. Retroviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). *Fields virology*. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. Cap.58, p.1767-1848.

- CRAWFORD, P.C. et al. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.226, p.1503-1507, 2005.
- CRAWFORD, T.B. et al. Chronic Arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v.207, p.997-999, 1980.
- DIVERS, T.J. et al. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial dairy herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v.23, p.133-141, 1995.
- FLYNN, J.N.; HANLON, L.; JARRET, O. Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. **Immunology**, v.101, p.120-125, 2000.
- GOMES-KELLER, M.A. et al. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. **Veterinary Microbiology**, v.112, p.11-21, 2006.
- GONDA, M.A. Bovine immunodeficiency virus. **AIDS**, v.6, p.759-776, 1992.
- HEATON, P.R.; JOHNSTONE, P.; BROWNLIE, J. Investigation of the cellular tropism of bovine immunodeficiency-like virus. **Research in Veterinary Science**, v.65, p.33-40, 1998.
- HECHT, S.J. et al. Distribution of endogenous type B and type D sheep retrovirus sequences in ungulates and other mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.3297-3302, 1996.
- ISHIDA, T.; TOMODA, I. Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.52, p.645-648, 1990.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine leukemia virus. Part I. Descriptive epidemiology, clinical manifestation, and diagnostic tests. **Continuing education article 12. The Compendious, North American Edition. Food Animal**, v.13, p.315-327, 1991.
- KETTMANN, R. et al. Bovine leukemia virus: An exogenous RNA oncogenic virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.73, p. 1014-1018, 1976.
- LARA, V.M. **Estudo epidemiológico e genético do vírus da imunodeficiência felina identificados no estado de São Paulo**. 2004. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) || Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- LEVY, J.K.; CRAWFORD, P.C.; SLATER, M.R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.225, p.1558-1561, 2004.
- MANSKY, L.M.; TEMIN, H.M. Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. **Journal of Virology**, v.68, p.494-499, 1994.
- MEAS, S. et al. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. **Veterinary Microbiology**, v.84, p.275-282, 2002.
- MONTI, G.E.; FRANKENA, K. Survival analysis on aggregate data to assess time to sero-conversion after experimental infection with Bovine Leukemia Virus. **Preventive Veterinary Medicine**, v.68, p.241-262, 2005.
- MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999. 629p.
- NARAYAN, O. et al. Visna-Maedi: the prototype lentiviral disease. In: NATHANSON, N. **Viral pathogenesis**. New York: Lippincott-Raven, 1997. Cap.27. p.657-668.
- PALMARINI, M. et al. Jaagsiekte retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. **Journal of Virology**, v.73, p.6964-6972, 1999.
- PEDERSEN, N.C. et al. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v.235, p.790-793, 1987.
- PETERHANS, E. et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, v.35, p.257-274, 2004.
- RAVAZZOLO, A.P. et al. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. **Virology**, v.350, p.116-127, 2006.
- SCHWARTZ, I.; LÉVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Veterinary Research**, v.25, p.521-536, 1994.
- SUAREZ, D.L.; WHETSTONE, C.A. Comparison of different PCR tests to detect bovine lentivirus in cell culture and experimentally and naturally infected cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.421-424, 1997.
- TAVARES, L.; PEREIRA, J.M. Patogênese das infecções por retrovírus da sub-família Oncornavirinae. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.526, p.61-72, 1998.
- TORRES, A.N.; MATHIASON, C.K.; HOOVER, E.A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**, v.332, p.272-283, 2005.
- VAN DER MAATEN, M.J.; BOOTHE, A.D.; SEGER, C.L. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v.49, p.1649-1657, 1972.
- VON GROLL, A. et al. Detecção do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em bovinos naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9., 1997, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS, 1997. p.104.

OUTRAS FAMÍLIAS VIRAIS

Fernanda Silveira Flores Vogel¹
& Eduardo Furtado Flores

32

1 Introdução	841
2 <i>Polyomaviridae</i>	841
2.1 Classificação	842
2.2 Propriedades gerais	842
2.3 Ciclo replicativo	842
2.4 Biologia e patogenia	842
3 <i>Hepadnaviridae</i>	844
3.1 Classificação	844
3.2 Propriedades gerais	844
3.3 Ciclo replicativo	844
3.4 Biologia e patogenia	845
4 <i>Arenaviridae</i>	846
4.1 Classificação	846
4.2 Propriedades gerais	846
4.3 Ciclo replicativo	846
4.4 Biologia e patogenia	847
5 <i>Astroviridae</i>	848
5.1 Classificação	848
5.2 Propriedades gerais	848
5.3 Ciclo replicativo	849
5.4 Biologia e patogenia	849
6 <i>Filoviridae</i>	849
6.1 Classificação	850
6.2 Propriedades gerais	850
6.3 Ciclo replicativo	850
6.4 Biologia e patogenia	851

¹ Luiz Carlos Kreutz elaborou a seção 7.4.2 (Vírus da pancreatite necrosante dos salmões, INPV).

7 Birnaviridae	851
7.1 Classificação	851
7.2 Propriedades gerais	851
7.3 Ciclo replicativo	852
7.4 Birnavírus de importância veterinária	852
7.4.1 Vírus da doença de Gumboro	852
7.4.2 Vírus da pancreatite necrótica infecciosa	855
8 Bornaviridae	856
8.1 Classificação	856
8.2 Propriedades gerais	857
8.3 Ciclo replicativo	857
8.4 Biologia e patogenicidade	858
8.5 Doença de Borna	858
9 Bibliografia consultada	859

1 Introdução

Algumas famílias abrigam vírus que possuem importância limitada, como patógenos de animais de companhia ou de criação, apresentando menor relevância em medicina veterinária. Este capítulo abordará, de forma sucinta, os principais aspectos das famílias de vírus cujos membros possuem importância clínica limitada em animais de interesse veterinário. Dentre os membros dessas famílias, alguns possuem importância como patógenos humanos; outros são patógenos de animais de laboratório, de invertebrados ou produzem doenças apenas em animais silvestres; um terceiro grupo abrange vírus que, aparentemente, não estão envolvidos com doença em vertebrados e a sua importância limita-se a aspectos peculiares de sua estrutura, biologia e ecologia.

Deve-se ressaltar que os critérios utilizados nesta classificação são relativos, e que as linhas que delimitam os grupos de vírus de acordo com a sua importância clínica são tênues, podendo ser circunstanciais e temporárias. Certos agentes podem ser considerados pouco importantes dentro de um contexto, mas são muito importantes em outras situações. Da mesma forma, vírus historicamente considerados pouco importantes podem adquirir importância clínica devido a alterações genéticas ou ecológico-ambientais que influenciam as suas interações com os hospedeiros, podendo resultar na ocorrência de doenças humanas e animais. Um exemplo recente é a adaptação do vírus da influenza a cães, espécie até então considerada refratária à infecção.

Ao final deste capítulo, será apresentada a família *Birnaviridae*, uma pequena família, que abriga pelo menos dois vírus importantes em animais: o INPV (vírus da pancreatite necrótica infecciosa), que infecta peixes e possui importância em criatórios de salmões, e o IBDV (vírus da doença de Gumboro ou doença da bursa de Fabricius), que infecta galinhas e possui grande importância na avicultura comercial em vários países. Outro vírus que possui importância relativa em alguns países é o vírus da doença de Bor-na (BDV), pertencente a família *Bornaviridae*, que

infecta principalmente, mas não exclusivamente, eqüinos.

2 Polyomaviridae

A família *Polyomaviridae* era classificada anteriormente como uma subfamília da *Papovaviridae*, cuja denominação se devia aos vírus protótipos de cada subfamília: *Pa* (papilomavírus de coelhos); *po* (poliomavírus de camundongos); *va* (agente vacuolizante, vírus símio 40, SV-40). Atualmente, os poliomavírus e o protótipo SV-40 são classificados separadamente, na família *Polyomaviridae*. O interesse maior nesses vírus se iniciou com a descoberta de que o SV-40 e outros poliomavírus eram capazes de produzir tumores em *hamsters* (por isto foram denominados pequenos vírus DNA tumorais). O SV-40 foi descoberto acidentalmente como contaminante de linhagens celulares de macacos rhesus utilizadas para a produção de vacinas contra a poliomielite. Como consequência, aproximadamente 50 milhões de doses de vacinas produzidas contra a poliomielite e utilizadas na década de 1950 estavam contaminadas com o SV-40. Posteriormente, constatou-se que o SV-40 era capaz de produzir tumores em *hamsters*, aumentando a preocupação sobre uma possível atividade tumorigênica também em humanos. Embora estudos extensivos realizados durante décadas não tenham sido capazes de demonstrar associação entre o SV-40 e tumores humanos, estudos recentes demonstraram a presença de seqüências de DNA e antígenos do SV-40 em certos tumores raros em humanos, renovando o interesse por este vírus.

O interesse inicial pelos poliomavírus deveu-se ao seu potencial oncogênico. No entanto, estes vírus foram mais estudados como modelos para a Virologia e Biologia Molecular do que como patógenos humanos ou animais. Importantes conhecimentos na Biologia Molecular, como a estrutura do DNA superenrolado, origens e iniciação da replicação do DNA, estrutura e função de promotores e *enhancers*, *splicing* alternativo e regulação da expressão gênica, entre outros, foram obtidos a partir de estudos realizados com esses vírus.

2.1 Classificação

Os vírus da família *Polyomaviridae* infectam animais e humanos, e todos pertencem ao gênero *Polyomavirus*. Entre estes vírus estão: poliomavírus de camundongos (PyV), vírus K (camundongos), vírus símio 40 (SV-40) (macaco rhesus), agente símio 12 (SA-12) (babuíno), poliomavírus linfotrópico (LPyV) (macaco-verde-africano), poliomavírus bovino (BPyV), vírus vacuolizante renal de coelhos (RKV), poliomavírus de *hamsters* (HaPV), poliomavírus de ratos atímicos (ARPyV), vírus da doença de *Budgerigar fledgling* (BFDV) (psitacídeos), poliomavírus JC (JCV) (humanos), vírus BK (BKPyV) (humanos), poliomavírus B linfotrópico, o vírus pneumotrópico de murinos (MPtV), o Kilham poliomavírus (KPyV) e o vírus do rim de fetos do macaco rhesus.

2.2 Propriedades gerais

As principais propriedades biológicas e moleculares dos poliomavírus estão apresentadas no Quadro 32.1. Os poliomavírus são vírus que geralmente produzem infecções subclínicas persistentes em seus hospedeiros naturais. Alguns deles estão associados com a produção de tumores em espécies heterólogas, principalmente *hamsters*.

2.3 Ciclo replicativo

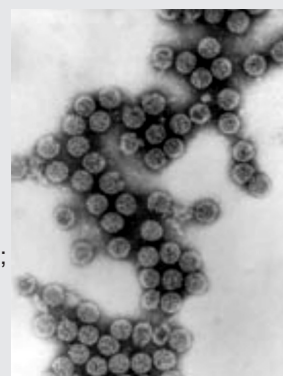
Os detalhes da replicação dos poliomavírus estão apresentados com detalhes no capítulo referente à replicação dos vírus DNA. Do ponto de vista biológico, é importante ressaltar que a replicação desses vírus em células de espécie homóloga ou heteróloga pode ter consequências diferentes. A infecção de células permissivas (espécie homóloga) resulta na ocorrência de todas as etapas do ciclo e na conseqüente produção de progênie viral infecciosa. Por outro lado, a infecção de células semi-permissivas (geralmente de espécies heterólogas) resulta em replicação abortiva, na qual ocorre apenas a expressão dos genes iniciais, sem a replicação do genoma ou produção das proteínas estruturais (tardias). A persistência do genoma viral nessas células, associada com a expressão contínua dos antígenos T, pode levar à imortalização e transformação celular.

2.4 Biologia e patogenia

Em geral, os poliomavírus humanos e animais estão mais freqüentemente associados com infecções subclínicas e apenas esporadicamente produzem sinais clínicos ou tumores em hospedeiros heterólogos. Portanto, possuem importância limitada em medicina veterinária. Alguns,

Polyomaviridae

- Vírions pequenos (45 nm), icosaédricos, sem envelope;
- Genoma: DNA circular, fita dupla, 5 kb;
- Genoma conjugado com histonas formando um minicromossomo;
- Existem poliomavírus de vários mamíferos de humanos e aves;
- Espectro restrito de hospedeiros;
- Não replicam produtivamente em outra espécie;
- Causam infecções inaparentes na maioria dos hospedeiros naturais;
- Alguns vírus produzem tumores em *hamsters* recém-nascidos;
- Infecção de células heterólogas pode resultar em transformação;
- Chamados de "pequenos vírus DNA tumorais".



Fonte: PHIL Library, CDC.

Quadro 32.1. Propriedades biológicas e moleculares da família *Polyomaviridae*. À direita: fotografia de microscopia eletrônica de vírions do SV-40.

no entanto, podem estar associados com doença severa, como o BFDV. A Tabela 32.1 apresenta os principais poliomavírus animais, os seus hospedeiros e os aspectos mais importantes da infecção.

Dois poliomavírus humanos já foram identificados até o presente: os vírus JC e BK. Esses vírus infectam grande parte das pessoas durante a infância ou adolescência, produzindo infecções subclínicas ou com sinais clínicos discretos, e permanecem latentes ou persistentes no epitélio renal de algumas pessoas. Acredita-se que cerca de 80% da população mundial apresente anticorpos contra esses vírus. A associação desses agentes com enfermidade é incerta, embora o BKV já tenha sido isolado de pacientes transplantados imunodeprimidos e o JCV já tenha sido identificado no cérebro de pacientes com leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML). Já foi

demonstrado que o JCV é capaz de estabelecer infecção latente em linfócitos, no trato urogenital e no cérebro de pessoas infectadas. Em indivíduos imunodeprimidos, o vírus pode reativar e produzir infecção clínica. Nestes indivíduos, o JCV pode determinar a PML, que é uma enfermidade degenerativa que afeta as células oligodendríticas. As pessoas doentes apresentam perda de memória, confusão mental, desorientação, ataxia, hemiparesia, incoordenação e anormalidades visuais. A morte pode ocorrer entre três e seis meses após o início dos sintomas. Além disso, o JCV já foi encontrado associado com nefropatias em pacientes recém-transplantados. Quanto ao BKV, não há evidências de que este vírus determine infecção clínica em pessoas imunocompetentes. Em pacientes que receberam transplante renal, o BKV também é incriminado como uma das causas de insucesso do transplante.

Tabela 32.1. Principais poliomavírus animais, hospedeiros e principais aspectos da infecção

Vírus	Hospedeiro	Características principais
Poliomavírus de camundongos (PyV)	Camundongos	Infecção natural em camundongos silvestres; infecção de camundongos de laboratórios e colônias; causa infecção renal persistente
Vírus K (PyK)	Camundongos	Infecção natural de camundongos, replica nos endotélios pulmonares
Vírus símio 40 (SV-40)	Macacos rhesus	Infecção renal persistente em macacos silvestres na Ásia
Agente símio 12 (SA-12)	Baboons	Infecção natural em baboons na África
Poliomavírus linfotrópico (LPV)	Macaco-verde-africano	Infecta linfoblastos da linhagem B
Poliomavírus bovino (BPyV)	Bovinos	Comum em bovinos; persiste nos rins
Vírus vacuolizante renal de coelhos (RKV)	Coelhos	Infecção natural em coelhos-cauda-de-algodão
Poliomavírus de hamsters (HaPV)	Hamsters	Associado com tumores cutâneos
Poliomavírus de ratos atímicos (ARPyV)	Ratos atímicos	Infecta a glândula parótida
Vírus da doença de <i>Budgerigar fledgling</i> (BFDV)	Psitacídeos	Doença aguda e fatal em psitacídeos

3 Hepadnaviridae

A família *Hepadnaviridae* é composta por vírus DNA pequenos, que apresentam um tropismo marcante por células hepáticas. Essa família abriga um importante patógeno de humanos, o vírus da hepatite B (HBV), que é o seu protótipo. Por isso, os hepadnavírus são genericamente denominados vírus das hepatites B. O HBV é considerado um dos principais patógenos de humanos e, em todo mundo, acredita-se que cerca de 300 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas. Entre as consequências da infecção pelo HBV, estão a hepatite aguda ou crônica, infecção subclínica persistente, cirrose e o carcinoma hepatocelular (HCC).

Esta família também abriga alguns vírus de animais, como os hepadnavírus de esquilos (*ground squirrel hepatitis virus*, GSHV), marmotas (*woodchuck hepatitis virus*, WHV) e patos (*duck hepatitis B virus*, DHBV). Recentemente, outros hepadnavírus foram identificados em garças, gansos, marsupiais e orangotangos. Os hepadnavírus possuem tropismo marcante por células hepáticas, e as manifestações clínicas da infecção são predominantemente hepáticas embora não exclusivamente.

3.1 Classificação

Os vírus da família *Hepadnaviridae* são classificados em dois gêneros, de acordo com os seus hospedeiros naturais, a sua estrutura e organização genômica. Os *Orthohepadnavirus* infectam mamíferos (marmotas e esquilos) e os *Avihepadnavirus* infectam aves (patos, gansos, garças e outras espécies), produzindo hepatite do tipo B em seus hospedeiros.

3.2 Propriedades gerais

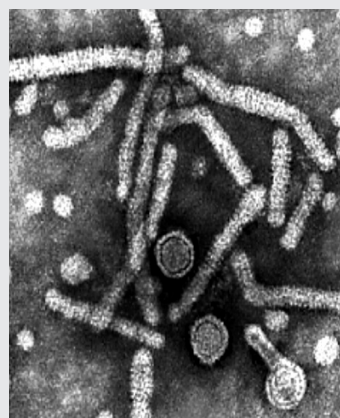
As principais propriedades biológicas e moleculares dos hepadnavírus estão apresentadas no Quadro 32.2. Dentre as propriedades biológicas mais marcantes, destacam-se o hepatotropismo e a capacidade de produzirem infecções hepáticas persistentes, muitas vezes, seguidas de desenvolvimento de cirrose hepática e de carcinoma hepatocelular.

3.3 Ciclo replicativo

O ciclo replicativo dos *hepadnavírus* é único entre os vírus animais e inclui uma etapa de transcrição reversa – distinta dos retrovírus. Após a

Hepadnaviridae

- Vírions pequenos (42-47 nm), esféricos, com envelope;
- Nucleocapsídeo icosaédrico;
- Genoma DNA circular (3.0 to 3.3 kb), fita parcialmente dupla;
- Partículas subvirais em abundância (esféricas, filamentosas);
- A polimerase viral está presente nos vírions;
- O ciclo replicativo envolve uma etapa de transcrição reversa;
- Parte da replicação do genoma no núcleo parte no citoplasma;
- Não replicam bem em cultivo celular;
- Espectro restrito de hospedeiros in vivo;
- Hepatotropismo marcante;
- Produzem infecções hepáticas persistentes;
- Associados com carcinoma hepatocelular (HCC).



Fonte: Dr Linda Stannard.uct.ac.za

Quadro 32.2. Propriedades biológicas e moleculares dos hepadnavírus. À direita: fotografia de microscopia eletrônica de vírions e partículas subvirais esféricas e filamentosas do HBV.

penetração na célula, transporte ao núcleo e desnudamento, o DNA genômico é circularizado em uma fita parcialmente dupla e é convertido por enzimas celulares e/ou pela polimerase viral em uma molécula circular, covalentemente fechada de fita dupla (*covalently closed circle, ccc*). A molécula de DNA *ccc* serve de molde para a transcrição pela RNA polimerase II celular, originando RNAs mensageiros subgenômicos (mRNA) e um RNA mensageiro da extensão do genoma (pgRNA). Esses RNAs são exportados para o citoplasma, onde os mRNA são traduzidos nas proteínas virais (polimerase, capsídeo e envelope). A polimerase recém-produzida pela tradução utiliza o pgRNA como molde e realiza transcrição reversa, resultando em uma cópia de DNA complementar (cDNA), que é convertida em fita dupla pela própria polimerase. Essa reação ocorre em capsídeos recém-formados e é interrompida quando ocorre o brotamento e egresso dos vírions das células. Como resultado, os vírions contêm, no seu interior, uma molécula de DNA de fita parcialmente dupla. Parte desses vírions pode reciclar para o núcleo e reiniciar o ciclo; outra parte é liberada da célula.

3.4 Biologia e patogenia

A infecção pelo HBV pode ser subclínica ou resultar em enfermidade hepática, caracterizada por hepatite aguda a crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular. A maioria das pessoas infectadas

se recupera da infecção. No entanto, em algumas pessoas, a infecção se torna persistente, determinando uma doença hepática de moderada a severa, com taxas de morbidade e mortalidade baixas. A extensão e a severidade da infecção pelo HBV dependem de fatores virais e do hospedeiro. Sabe-se que esse vírus apresenta mecanismos de adaptação ao hospedeiro, como mutações em determinadas regiões do genoma, favorecendo a infecção persistente.

Após a infecção, o início da injúria hepatocelular ocorre pela indução de apoptose mediada por linfócitos T citotóxicos em hepatócitos infectados. Durante a infecção aguda, a patologia varia de leve a moderada. Em alguns casos, no entanto, existe uma reação inflamatória intensa, que resulta em uma grande injúria hepatocelular e em hepatite fulminante. Por outro lado, a hepatite crônica resulta da injúria contínua dos hepatócitos. Em pacientes assintomáticos, existe certa tolerância aos antígenos do HBV, o que resulta em injúria leve ou ausente aos hepatócitos, pelas células do sistema imune. Para um melhor esclarecimento da patogenia do HBV, animais, como camundongos e chimpanzés, têm sido utilizados como modelos experimentais. Uma vacina recombinante, contendo a glicoproteína de superfície do HBV, produzida em levedura, tem sido utilizada em humanos. A Tabela 32.2 apresenta os principais hepadnavírus, os seus hospedeiros e as principais características da infecção em cada espécie.

Tabela 32.2. Hospedeiros e principais aspectos da patogenia dos hepadnavírus

	HBV	WHV	GSHV	DHBV
Hospedeiro	Humanos Chimpanzés	Marmotas	Esquilos Marmotas	Patos Gansos
Tropismo	Fígado Rins Pâncreas Leucócitos	Fígado Rins Pâncreas Leucócitos	Fígado	Fígado Rins Pâncreas Baço
Manifestações clínicas	Portadores subclínicos; hepatite aguda e crônica; cirrose, HCC	Portadores subclínicos; hepatite; HCC	Portadores subclínicos; hepatite; HCC	Portadores subclínicos; hepatite

4 *Arenaviridae*

Os membros da família *Arenaviridae* são vírus que possuem roedores silvestres da Europa, África e Américas como hospedeiros naturais. Nesses hospedeiros, os arenavírus geralmente produzem infecções subclínicas persistentes, sendo continuamente excretados na saliva, urina e fezes, condições que favorecem a sua transmissão e disseminação. A exposição humana é usualmente ocupacional e freqüentemente envolve trabalhadores rurais. As consequências da infecção humana variam desde infecções inaparentes, com sintomatologia leve a moderada, até febre hemorrágica fatal. Por isso, esses vírus são genericamente denominados agentes de febres hemorrágicas. Mais de 20 espécies de arenavírus já foram identificadas em vários continentes; todas, provavelmente, associadas com hospedeiros roedores, e algumas associadas com doença humana. O protótipo dessa família é o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), um agente que infecta roedores silvestres, colônias de roedores cativos e, ocasionalmente, pessoas. O interesse maior no LCMV tem sido como modelo para estudos imunológicos. Descobertas importantes, como a imunotolerância, imunopatologia induzida por vírus, reconhecimento de antígenos virais por linfócitos T CD4+ e CD8+, atividade das células NK (*natural killer*), entre outras, vieram de estudos com o LCMV. Os arenavírus que causam doença humana devem ser manipulados em laboratórios com estritas condições de biossegurança para evitar a exposição (nível 4 de biossegurança).

4.1 Classificação

A família *Arenaviridae* apresenta um único gênero (*Arenavirus*). Os arenavírus são classificados em dois grupos, com base em propriedades genéticas e antigênicas: os arenavírus do Novo Mundo (Junin, Machupo, Guanarito e vírus Sabiá) e os arenavírus do Velho Mundo (LCMV e Lassa vírus). O LCMV é o protótipo do segundo grupo, que também inclui os arenavírus da África.

Os arenavírus do Novo Mundo são agentes associados com febres hemorrágicas nas Américas, incluindo o vírus Junin (febre hemorrágica

argentina); Machupo (febre hemorrágica boliviana); Guanarito (febre hemorrágica venezuelana) e Sabiá (febre hemorrágica brasileira). Esses e outros arenavírus foram identificados nas Américas do Norte, Central e do Sul em infecções persistentes em várias espécies de roedores silvestres e, ocasionalmente, infectando humanos, nos quais podem causar desde infecções subclínicas até febre hemorrágica fatal.

O número de arenavírus cresce continuamente à medida que estudos epidemiológicos são realizados nos nichos ecológicos dos seus hospedeiros naturais. A importância de vários desses vírus recém-descobertos, para a saúde humana e animal, no entanto, é difícil de ser estimada no presente.

4.2 Propriedades gerais

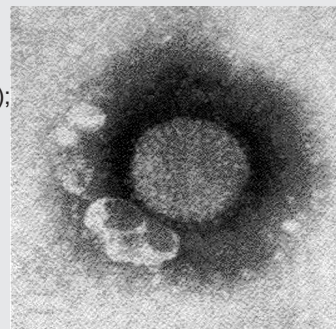
As principais propriedades biológicas e moleculares dos arenavírus estão apresentadas no Quadro 32.3. Os vírions envelopados contêm ribossomos celulares no seu interior, o que confere um aspecto granular a sua superfície. O genoma é composto por duas moléculas de RNA lineares, fita simples (S = 3.4 kb; and L = 7.2 kb) de polaridade negativa. No entanto, os produtos dos genes localizados na metade 3' dos segmentos genômicos são codificados no sentido genômico, estratégia denominada *ambissense*. A replicação ocorre no citoplasma, geralmente é não-citolítica e freqüentemente resulta na produção de partículas defectivas. Como a infecção, na maioria das vezes, é não-citolítica, pode favorecer o estabelecimento de infecções persistentes *in vivo*.

4.3 Ciclo replicativo

Os vírions se ligam aos receptores na superfície celular através da glicoproteína GP1 e são internalizados por endocitose. A fusão do envelope com a membrana do endossomo é dependente de pH e mediada pela GP2, ocorrendo, então, a liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma. A proteína L (RNA polimerase dependente de RNA), que está presente no nucleocapsídeo associada ao genoma, sintetiza o mRNA do gene da nucleoproteína (NP) (presente no segmento S) e do gene da proteína L (segmento L). Estes genes,

Arenaviridae

- Vírions pleomórficos (110 a 130 nm), envelopados;
- Envelope recoberto com peplômeros cubóides (10-12 nm);
- Os vírions contêm ribossomos; aparência de areia (areia = *arena*);
- Genoma: 2 moléculas de RNA fita simples, polaridade negativa;
- Um dos segmentos de RNA é *ambissense*;
- Dois nucleocapsídeos helicoidais; cada um com um RNA;
- Polimerase viral presente nos vírions;
- Roedores silvestres são os hospedeiros naturais,
- Replicação citoplasmática, geralmente não-citolítica;
- Infecções persistentes são freqüentes *in vivo*.



Fonte: Scientific American. ICTVdB.

Quadro 32.3. Propriedades biológicas e moleculares dos arenavírus. À direita: fotografia de microscopia eletrônica de um vírion desta família.

portanto, são codificados pelo RNA com sentido antígenômico. Os genes que estão localizados na metade 3' dos segmentos genômicos (segmento S = glicoproteínas GPG; segmento L = proteína Z) são codificados no sentido do genoma. A sua expressão ocorre pela tradução de RNAs (com o mesmo sentido do genoma) que são produzidos pela transcrição do RNA de sentido antígenômico. Esses RNAs seriam, por definição, de sentido negativo, porém são traduzidos em proteínas. Essa estratégia de expressão é denominada *ambissense* e também ocorre em alguns membros da família *Bunyaviridae*. O precursor das GPG sofre modificações pós-translacionais, em que a GPG é clivada em GP1 e GP2. O RNA genômico se conjuga com a proteína NP, formando o nucleocapsídeo, que é transportado até a membrana plasmática, onde interage com as glicoproteínas e realiza o brotamento. As moléculas de GP1 formam homotetrâmeros, mantidas unidas por pontes dissulfeto. A GP2, ancorada na membrana, também forma homotetrâmeros. O complexo da GP1 e da GP2 interage e forma as projeções na superfície dos vírions. Na morfogênese das partículas víricas, a GP2 interage com a NP. Os vírions adquirem envelope e são liberados sem, necessariamente, causar lise celular.

4.4 Biologia e patogenia

A infecção de mamíferos com os arenavírus pode cursar de forma aguda ou crônica, com taxas variáveis de morbidade e mortalidade. Os

roedores, em particular os camundongos, cobaias e *hamsters*, são excelentes modelos experimentais para estudos da infecção. Poucas informações estão disponíveis a respeito da infecção de caninos, felinos, animais de produção e de vertebrados não-mamíferos por arenavírus. Porém sabe-se que esses animais podem potencialmente participar da epidemiologia da infecção. Embora tenha sido demonstrado que o LCMV replica em mosquitos, além de outros arenavírus terem sido isolados de artrópodes, o significado epidemiológico desses achados permanece incerto.

A patogenia dos arenavírus envolve uma replicação inicial no sítio de penetração, geralmente nos pulmões, após a inalação de aerossóis contaminados. Os linfonodos do hilo, tecidos pulmonares e, mais tardiamente, outros órgãos parenquimatosos são importantes sítios de replicação viral.

O LCMV produz infecção e doença humana, eventos que ocorrem quando roedores silvestres infectados entram em contato com pessoas. Esse vírus também produz infecções persistentes assintomáticas em colônias de camundongos e *hamsters*. Outras espécies, como cães, coelhos, suínos e primatas, também podem ser ocasionalmente infectadas.

Em roedores, a duração da viremia parece estar diretamente associada com a idade em que ocorre a infecção. Para os vírus Lassa e LCMV, foi demonstrado que a viremia persiste por toda a vida quando a infecção dos roedores é intra-uterina ou ocorre logo após o nascimento. Quando

roedores adultos são infectados, a viremia é transitória. Já para o vírus Junin, a infecção intra-uterina determina morte fetal e aborto. A infecção de neonatos resulta em viremia que persiste por toda a vida; já a infecção de adultos pode resultar em viremia transitória ou persistente. Consequentemente, a presença da infecção persistente é decorrente da interação de vários fatores.

5 Astroviridae

Os astrovírus são agentes muito comuns que infectam animais e humanos, mas raramente estão associados com enfermidade clínica. Ocasionalmente são encontrados associados com outros agentes em casos de diarreia. Esses vírus foram descobertos, inicialmente, pelo exame ultramicroscópico de fezes de crianças e, posteriormente, foram encontrados nas fezes de várias espécies, como cães, gatos, ovinos, bovinos, suínos, entre outras. Em aves, manifestações clínicas intestinais e hepáticas associadas com astrovírus têm sido descritas. Patos jovens podem desenvolver hepatite aguda fatal quando infectados. Os astrovírus também têm sido implicados como co-fatores em casos de diarreia em crianças em países subdesenvolvidos.

O nome da família deriva da aparência de estrela de cinco ou seis pontas que alguns vírions apresentam quando examinados sob microscopia eletrônica. Aspectos moleculares e biológicos

importantes distinguem os astrovírus de outros pequenos vírus RNA de fita simples, como os picornavírus e os calicivírus.

5.1 Classificação

Os astrovírus são classificados em dois gêneros: *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. Os vírus que pertencem ao gênero *Mamastrovirus* infectam mamíferos e incluem vírus de bovinos (dois sorotipos – US1 e US2), felinos, ovinos, suínos, marta e humanos (oito sorotipos). As espécies de mamastrovírus são definidas de acordo com o hospedeiro de origem. Os *Avastrovirus* infectam aves, incluindo pássaros, galinhas, patos e perus. O vírus da nefrite aviária (ANV), que está associado com nefrite aguda em galinhas, inclui-se nesse gênero.

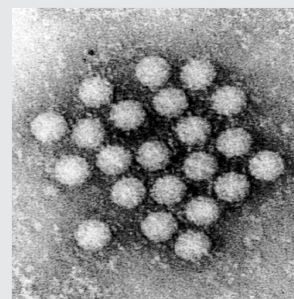
Os astrovírus são espécie-específicos e não apresentam reatividade sorológica cruzada. A análise sorológica de vários isolados de diferentes espécies (sete de humanos, um de ovinos, um de suínos, três de bovinos e um de aves) não demonstrou relação antigênica entre eles.

5.2 Propriedades gerais

As principais propriedades biológicas e moleculares dos astrovírus estão apresentadas no Quadro 32.4. Esses agentes apresentam várias características moleculares e de replicação seme-

Astroviridae

- Vírions esférico-icosaédricos, 28 a 30 nm, sem envelope;
- Alguns vírions apresentam aparência de estrelas (astro = estrela);
- Genoma RNA linear polaridade positiva, 6.8 kb;
- Proteína ligada na extremidade 5'; cauda poliA na extremidade 3';
- Duas proteínas do capsídeo; várias proteínas não-estruturais;
- Tradução parcial do genoma; produção de mRNA subgenômicos;
- Replicação citoplasmática;
- Progênie viral acumula-se em arranjos cristalinos no citoplasma;
- A liberação de vírions ocorre por lise celular.



Fonte: www.epa.gov

Quadro 32.4. Propriedades biológicas e moleculares dos astrovírus. À direita, fotografia de microscopia eletrônica de vírus desta família.

lhantes a outros vírus RNA de polaridade positiva, como os calicivírus.

5.3 Ciclo replicativo

O ciclo replicativo dos astrovírus ainda não foi completamente esclarecido. Porém, sabe-se que, durante a infecção, são produzidos RNAs subgenômicos, além dos RNA genômicos e antígenômicos. A exemplo de outros vírus RNA de polaridade positiva, a replicação do genoma envolve a síntese de uma molécula de RNA de sentido antígenômico (polaridade negativa).

O genoma viral contém três ORFs. A ORF-1a e a ORF-1b codificam as proteínas não-estruturais e estão localizadas nos dois terços próximos à extremidade 5'. A ORF-2 codifica a proteína do capsídeo e está localizada no terço próximo à extremidade 3'. As ORF-1a e 1b estão presentes apenas no RNA genômico e estão separadas por um *frameshift* dos ribossomos. Os seus produtos (proteínas não-estruturais nsP1a e nsP1b) são sintetizados a partir da tradução direta do RNA genômico. Como a ORF-2 está presente tanto no RNA genômico como nos mRNAs subgenômicos, sugere-se que o papel do mRNA subgenômico seja a codificação para a síntese de maior quantidade de proteínas estruturais.

A ORF-1a codifica uma protease, que é importante no processamento das proteínas virais. A ORF-1b codifica a RNA polimerase viral (RNA polimerase dependente de RNA); e a ORF-2 codifica um precursor da proteína do capsídeo. Esse precursor é clivado antes da formação da partícula vírica.

As duas proteínas não-estruturais nsP1a (protease) e nsP1b (replicase), após o processamento por proteases virais e celulares, dão origem às proteínas responsáveis pela transcrição do RNA genômico, produzindo o RNA de sentido antígenômico. O RNA antígenômico serve de molde para a produção de múltiplas cópias de um RNA subgenômico (mRNA para produção da proteína do capsídeo) e para a produção de RNA genômico, para ser encapsidado na progênie viral. A replicação ocorre inteiramente no citoplasma, os vírions se acumulam em arranjos cristalinos e são liberados após a lise celular.

5.4 Biologia e patogenia

A patogenia da infecção pelos astrovírus é pouco conhecida. No entanto, a replicação desses vírus no intestino tem sido associada com o achatamento das vilosidades e a ocorrência de diarreia. Como a replicação desses vírus ocorre principalmente no epitélio intestinal, grandes quantidades de partículas víricas são excretadas nas fezes. A maioria das infecções é subclínica; algumas resultam em diarreia discreta autolimitantes – principalmente em animais jovens –; e casos de enfermidade severa são raros. Os indivíduos adultos dificilmente desenvolvem sinais clínicos devido à imunidade adquirida previamente.

Os sinais clínicos são mais frequentemente observados em casos de infecções múltiplas. Em infecções experimentais, suínos, felinos e bovinos são menos susceptíveis do que ovinos.

O astrovírus de peru (TAsTV) produz diarreia, que persiste por aproximadamente oito dias. Este mesmo vírus foi isolado de pássaros com uma síndrome entérica denominada PEMS (*poult enteritis mortality syndrome*). O vírus da nefrite aviária (ANV), que infecta galinhas, provoca retardamento do crescimento e nefrite intersticial aguda, sendo um exemplo de astrovírus que causa infecção extra-intestinal. A infecção de patos jovens (menos de seis semanas de idade) frequentemente resulta em hepatite aguda, que é fatal em aproximadamente 50% dos casos.

6 Filoviridae

Os filovírus foram os primeiros vírus associados com febre hemorrágica em humanos. Esses vírus foram inicialmente identificados em casos da doença em laboratoristas na Alemanha, na década de 1960. O vírus foi caracterizado e denominado vírus Marburg, tornando-se o protótipo dessa família. A origem do vírus Marburg foi, posteriormente, determinada e, provavelmente, ocorreu pela importação de macacos-verdes africanos de Uganda. Aproximadamente uma década depois, o vírus Ebola foi reconhecido como agente etiológico de surtos de febre hemorrágica no Zaire e no Sudão. Um vírus similar, denominado de Reston, foi introduzido nos EUA por

macacos importados das Filipinas. Desde então, surtos esporádicos de febre hemorrágica associados ao vírus Ebola têm sido descritos em vários países africanos. Nesses surtos, tem sido sugerida a participação de um hospedeiro silvestre como introdutor do agente na população humana. Uma vez introduzido na população, o vírus se dissemina geralmente por transmissão nosocomial (agulhas, práticas parenterais não-apropriadas) e por contato direto. Em alguns surtos, a taxa de letalidade pode chegar a 80%. O vírus Ebola é um dos vírus mais letais de humanos e é classificado como um agente de biossegurança nível 4. Embora o vírus Ebola e os demais filovírus apresentem um caráter claramente zoonótico, os reservatórios naturais do vírus permanecem desconhecidos e se constituem em um grande desafio para os epidemiologistas.

6.1 Classificação

A família *Filoviridae* pertence à ordem *Mononegavirales*, juntamente com outros vírus com genoma RNA não-segmentado de polaridade negativa. Na família *Filoviridae*, existem dois gêneros: os vírus semelhantes ao Ebola (*Ebola-like viruses*), com quatro espécies (Zaire, Sudan, Reston e Côte d'Ivoire), e o gênero dos vírus semelhantes ao Marburg (*Marburg-like viruses*). Não existe reatividade sorológica cruzada entre os vírus dos diferentes gêneros. No entanto, existem alguns epitopos em comum entre os vírus do grupo do Ebola.

6.2 Propriedades gerais

As principais propriedades biológicas e moleculares dos filovírus estão apresentadas no Quadro 32.5. Muitos aspectos estruturais e do ciclo replicativo são semelhantes aos das famílias *Rhabdoviridae* e *Paramyxoviridae*, também componentes da ordem *Mononegavirales*.

6.3 Ciclo replicativo

O ciclo replicativo dos filovírus inicia pela ligação da glicoproteína viral (GP) a receptores na superfície da célula hospedeira. Os vírions são internalizados em vesículas endocíticas, a penetração ocorre pela fusão do envelope com a membrana do endossomo, e o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma. O RNA genômico de polaridade negativa é utilizado como molde para a síntese de mRNAs monocistronicos individuais para cada gene. Estes mRNA contêm *cap*, são poliadenilados e traduzidos pelos ribossomos celulares. A transcrição e replicação são realizadas pela enzima replicase (RNA polimerase dependente de RNA) presente nos vírions. As proteínas virais podem sofrer modificações após a tradução. A GP0 (precursora da glicoproteína) é clivada em GP1 e GP2, que são altamente glicosiladas. A GP1 e a GP2 se ligam formando heterodímeros. Trímeros destes heterodímeros formam, então, os peplômeros da superfície dos vírions. A precursora da glicoproteína secretada (SGP) é clivada em SGP e em um peptídeo delta, ambos secre-

Filoviridae

- Vírions pleomórficos, filamentosos, em forma de U ou 6;
- Diâmetro uniforme (80 nm); extensão pode chegar a 14.000 nm;
- Nucleocapsídeo helicoidal (50 nm de diâmetro) pode atingir 800 nm;
- O envelope contém peplômeros (10 nm);
- Genoma RNA cadeia simples polaridade negativa (19.1 kb);
- RNA polimerase viral presente nos vírions;
- Os vírions possuem sete proteínas estruturais;
- Associados com febre hemorrágica;
- O vírus Ebola é um dos mais letais para humanos.



Fonte: Dr F. Murphy. ICTVdB.

Quadro 32.5. Propriedades biológicas e moleculares dos filovírus. À direita, fotografia de microscopia eletrônica de um virion do vírus Ebola.

tados. Quando a quantidade de proteínas virais no interior da célula atinge um determinado nível, ocorre a troca de transcrição para replicação. Utilizando o RNA genômico como molde, moléculas de RNA de sentido antígenômico (polaridade positiva) são sintetizadas e utilizadas como molde para a produção de mais moléculas de RNA de sentido genômico. Estas são encapsidadas por múltiplas cópias da nucleoproteína (NP), formando os nucleocapsídeos, que contêm ainda a replicase. Os nucleocapsídeos recém-formados se associam com as glicoproteínas do envelope, que estão inseridas na membrana plasmática da célula, local onde ocorre o brotamento e o egresso das partículas víricas.

6.4 Biologia e patogenia

Os filovírus são responsáveis pela forma mais severa de febre hemorrágica em humanos. Embora as taxas de mortalidade em surtos naturais de infecção pelo vírus Ebola sejam altas, a detecção de anticorpos em pessoas sem histórico clínico compatível com a doença sugere que esta infecção nem sempre está associada com sinais clínicos. Alternativamente, a existência de outros vírus antígenicamente relacionados ao vírus Ebola poderia explicar a presença desses anticorpos em populações saudáveis.

A patogenia do vírus Ebola tem sido extensivamente estudada em modelos experimentais, como macacos, cobaias e camundongos. Atualmente, os modelos mais utilizados são macacos e cobaias, pois a patogenia nessas espécies parece ser mais semelhante àquela observada em humanos.

Em macacos, a virulência dos filovírus é bastante variável, similarmente ao que ocorre em humanos. Entre os vírus semelhantes ao Ebola, os vírus Zaire são mais virulentos do que os Reston. A infecção pelos vírus Zaire progride rapidamente, sendo fatal entre quatro e oito dias após a infecção.

Os sinais da infecção pelos filovírus incluem febre, mialgia, calafrios e depressão, após um período de incubação de 4 a 10 dias. Posteriormente, os sinais clínicos refletem um envolvimento multissistêmico, o que pode determinar uma

variedade de sinais clínicos, que incluem sinais gastrintestinais, respiratórios, vasculares e neurológicos. A síndrome hemorrágica é caracterizada pela presença de petéquias, equimoses, tempo de coagulação aumentado e hemorragias nas mucosas. O exame *post-mortem* revela a presença de extensas hemorragias nas vísceras.

Vacinas contra o vírus Ebola estão em fase de pesquisa e desenvolvimento e podem auxiliar na redução da morbidade e mortalidade comumente associada com os surtos que ocorrem em comunidades africanas.

7 Birnaviridae

Os membros da família *Birnaviridae* são vírus que infectam vertebrados, insetos, moluscos e crustáceos. Os birnavírus de maior importância são os que infectam aves e peixes, entre eles, o agente da doença de Gumboro, também conhecida como doença da bursa de Fabricius. A doença de Gumboro possui grande repercussão sanitária na avicultura comercial de vários países.

7.1 Classificação

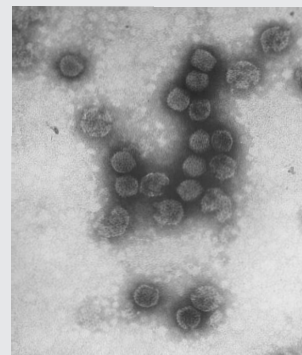
A família *Birnaviridae* apresenta três gêneros: *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus* e *Entomobirnavirus*. No gênero *Aquabirnavirus*, estão classificados vírus que infectam peixes, moluscos e crustáceos. Entre estes se destacam o vírus da pancreatite necrótica infecciosa (INPV) que infecta peixes, o vírus Tellina (TV-2) e o vírus *yellowtail ascites* (YTAV). O gênero *Avibirnavirus* abriga os vírus que infectam as aves (vírus da doença da bursa de Fabricius – IBDV) e o gênero *Entomobirnavirus* congrega vírus que infectam insetos. Tanto o INPV como o IBDV possuem diferentes sorotipos.

7.2 Propriedades gerais

As principais propriedades biológicas e moleculares dos birnavírus estão apresentadas no Quadro 32.6. O genoma é composto por duas moléculas de RNA de fita dupla (segmentos A e B). Cada segmento codifica uma poliproteína, que é posteriormente clivada em produtos funcionais.

Birnaviridae

- Vírions esférico-icosaédricos, sem envelope, 60 nm;
- Capsídeo icosaédrico, 5 proteínas, 162 capsômeros;
- Genoma RNA de fita dupla, 2 segmentos (A e B);
- Proteína (VPG) na extremidade 5'; sem poliA;
- Segmento A= 3.1kb, proteínas do capsídeo + protease;
- Segmento B= 2.8 - replicase viral;
- Replicam no citoplasma;
- Transcrição/replicação no interior dos capsídeos;
- IBDV= infecta linfócitos B, doença de Gumboro em aves.



Fonte: Dr S. McNulty; qub.ac.uk

Quadro 32.6. Propriedades biológicas e moleculares dos birnavírus. À direita, fotografia de microscopia eletrônica de vírions desta família.

Existe uma pequena ORF adicional presente no segmento maior (A). As proteínas do capsídeo e as proteínas não-estruturais são codificadas no segmento A; a RNA polimerase dependente de RNA é codificada no segmento B. O segmento A codifica através da ORF 1 uma proteína de 17 kDa (VP5), cuja função é desconhecida; a ORF 2 codifica uma poliproteína de 106 kDa que é processada, originando três proteínas. O primeiro produto é a VP2, que é a maior proteína do capsídeo. O segundo é a proteína não-estrutural (NS), chamada de VP4, que é uma protease que sofre truncamento e clivagem adicional; e a VP3, que é a proteína interna do capsídeo. A NS é assim denominada nos aquabirnavírus. Nos demais gêneros, essa proteína é denominada VP4. O segmento genômico B (2,8 kb) codifica uma única proteína de 94 kDa (VP1), a partir da ORF 3, que é a RNA polimerase dependente de RNA.

7.3 Ciclo replicativo

A replicação dos birnavírus ocorre no citoplasma das células hospedeiras. A penetração ocorre por endocitose e a estrutura dos vírions é desestabilizada pelo pH ácido presente no interior dos endossomos. A transcrição e a replicação do genoma ocorrem ainda no interior de capsídeos parcialmente desintegrados ou em capsídeos pré-formados. A primeira etapa é a transcrição das cadeias de RNA negativas pela transcriptase

presente nos vírions, formando os mRNAs para a síntese protéica. Cada segmento é transcrito em um único mRNA, cuja tradução resulta em uma poliproteína, que é clivada logo após a tradução. O mRNA do segmento A codifica quatro proteínas, sendo duas proteínas estruturais do capsídeo, uma protease e outra de função desconhecida. O segmento B codifica a replicase viral. Os RNAs de sentido positivo também servem de molde para a síntese de moléculas de RNA de sentido negativo. As moléculas de cadeia dupla (RNA positivo + RNA negativo) são, então, incluídas como genoma nas partículas víricas, juntamente com a replicase viral. A morfogênese ocorre no citoplasma, e as partículas víricas maduras são liberadas após a lise celular.

7.4 Birnavírus de importância veterinária

7.4.1 Vírus da doença de Gumboro

A doença de Gumboro é causada por um vírus da família *Birnaviridae* (*infectious bursal disease virus*, IBDV), ocorre em aves jovens e apresenta a bursa de Fabricius como órgão-alvo, sendo também conhecida como doença infecciosa da bursa de Fabricius (IBD). Esta enfermidade possui distribuição mundial e tem causado grandes perdas econômicas à indústria avícola em vários países, por determinar mortalidade e imunossupressão

nas aves infectadas. Uma importante consequência da infecção de frangos jovens pelo IBDV é a imunossupressão. Além disso, a infecção com cepas virulentas pode determinar taxas de mortalidade elevadas. As medidas de controle envolvem a vacinação e medidas gerais de biossegurança.

A doença de Gumboro foi inicialmente descrita, em 1962, por Cosgrove, na cidade de Gumboro, nos Estados Unidos, daí a sua denominação. Nos últimos anos, a emergência de variantes antigênicas e de cepas de alta virulência, que podem produzir doença clínica mesmo em animais vacinados, tem ressaltado a importância desta doença. Diferentes cepas do IBDV foram identificadas nos EUA (entre 1986 e 1987), na Bélgica e nos países baixos (em 1987). As cepas de alta virulência foram descritas na Europa em 1986. Tanto as cepas clássicas como as mais virulentas estão presentes em todos os países, com exceção da América do Norte e da Austrália, pois nestes dois países predominam as cepas variantes (maior virulência) do IBDV.

O IBDV apresenta dois sorotipos. No sorotipo 1, são classificados os isolados patogênicos do IBDV, que apresentam as células linfóides da bursa como alvo para replicação. Os IBDV do sorotipo 2 são isolados de perus e, geralmente, são apatogênicos. Pelas diferenças antigênicas entre os sorotipos, os frangos expostos ao sorotipo 2 não possuem proteção contra uma infecção posterior por um IBDV do tipo 1.

As galinhas são os únicos hospedeiros conhecidos que desenvolvem a forma clínica da infecção pelo IBDV, porém perus e patos também podem ser infectados. O vírus é transmitido pela via fecal-oral, com a ingestão de fezes e/ou outros materiais orgânicos contaminados, ou, ainda, verticalmente, via ovo. O vírus é bastante resistente às condições ambientais, sobrevive a 60°C por 60 minutos e em pH entre 3 e 9, o que representa um entrave para o combate à infecção.

Após a ingestão de material contaminado, o vírus pode ser detectado em macrófagos e em células linfáticas do duodeno, jejuno e ceco em quatro ou cinco horas. O duodeno, jejuno e ceco são os órgãos de replicação primária do vírus, que pode chegar ao fígado pelo sistema porta. A

presença do vírus no fígado pode ser detectada cinco horas após a infecção, onde as células de Küpfer fagocitam uma quantidade considerável de partículas víricas. A partir desses sítios de replicação inicial, o vírus invade a corrente sanguínea e se dissemina por vários órgãos, incluindo a bursa. Neste órgão linfóide, os linfócitos B imaturos, presentes nos folículos, são as principais células-alvo para a replicação viral. Aproximadamente 13 horas após a infecção, a maioria dos folículos da bursa apresenta antígenos virais. Uma segunda viremia ocorre aproximadamente 15 a 16 horas após a infecção. Os sinais clínicos, quando ocorrem, são observados em 64 a 72 horas após a infecção.

A severidade dos sinais clínicos e das lesões depende da virulência da cepa viral, da raça (corde ou postura), da idade e do *status* imunitário dos animais. O período de incubação da doença é muito curto, e os sinais clínicos são observados entre dois e três dias pós-exposição. As lesões na bursa de Fabricius são severas e geralmente permanentes nas aves infectadas, produzindo um quadro severo de imunossupressão. Essas aves apresentam maior susceptibilidade a outros agentes infecciosos (adenovírus, reovírus, *Mycoplasma* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., coccídeos e outros) e não respondem adequadamente a vacinações.

Duas formas da infecção são descritas: clínica e subclínica. A forma clínica ou aguda da doença ocorre em aves com três a seis semanas de idade, período de desenvolvimento intenso da bursa de Fabricius. Essas aves apresentam depressão, anorexia, diarreia, penas eriçadas, tremores e desidratação por três a quatro dias. A forma subclínica ocorre em aves com idade inferior a três semanas e é muito importante, pois causa imunossupressão severa. As aves mais jovens apresentam imunidade passiva, o que explica a menor incidência de doença clínica nessa faixa etária. Aves com mais de seis semanas de idade raramente desenvolvem sinais clínicos, porém produzem anticorpos contra o vírus.

Quando não há mortalidade, as aves se recuperam dentro de cinco a sete dias. Frequentemente os lotes não são uniformes, pois há baixo ganho de peso e menor conversão alimentar. Quando o vírus é introduzido na propriedade, a

taxa de mortalidade do surto pode ser superior a 90%. No entanto, taxas de mortalidade entre 20 e 30% são mais comuns.

Na necropsia, a atrofia da bursa é característica, os rins encontram-se aumentados, com o acúmulo de uratos e uma provável deposição de imunocomplexos nos glomérulos. Cepas de alta virulência causam lesões severas na bursa e em outros órgãos linfóides, como o timo, baço e a medula óssea. As alterações na bursa variam de acordo com a extensão e progressão da lesão. Dois a três dias após a infecção, a bursa apresenta edema e um transudato gelatinoso sobre a superfície serosa. A partir do quinto dia após a infecção, o transudato e o edema começam a desaparecer, e a bursa retorna a sua coloração acinzentada. Nos casos de doença aguda, petéquias são observadas nos músculos peitorais e nas coxas, pois o IBDV interfere com mecanismos de coagulação do sangue. O fígado pode apresentar-se edemaciado, e os intestinos com quantidade aumentada de muco. Microscopicamente, a principal alteração na arquitetura folicular da bursa ocorre em consequência da degeneração e necrose dos linfócitos na região medular e da apoptose de células na região central dos folículos. Estudos demonstraram que a imunodepressão induzida pelo IBDV se deve, em parte, à apoptose. Os linfócitos foliculares são substituídos por heterófilos, restos celulares necróticos e por células reticuloendoteliais hiperplásicas. À medida que a inflamação regride, formam-se cavidades císticas na região medular folicular, sinais de necrose e de fagocitose de células inflamatórias e fibroplasia do tecido conjuntivo interfolicular.

O diagnóstico da infecção deve ser baseado no quadro clínico, associado com as lesões observadas na necropsia e no exame histopatológico da bursa, além do histórico do lote. A microscopia eletrônica pode ser empregada para demonstrar o vírus nos órgãos-alvo. Antígenos virais podem ser demonstrados na bursa de Fabricius por imunofluorescência, imunistoquímica, precipitação em gel de ágar ou por testes imunoenzimáticos. O IBDV pode ser isolado pela inoculação em ovos embrionados livres de anticorpos anti-IBDV. Anticorpos podem ser detectados por ELISA na rotina. Para a caracterização de isola-

dos do IBDV, utiliza-se o teste de soroneutralização (SN), que é capaz de diferenciar os isolados em sorotipo e subtipo dentro do sorotipo 1. A técnica de RT-PCR tem sido cada vez mais utilizada para o diagnóstico. Quando associada com análise de restrição enzimática (RFLP), permite a identificação rápida das cepas de alta virulência e a caracterização de isolados entre os seis grupos moleculares do IBDV.

Em estádios mais avançados da infecção, é difícil confirmar o diagnóstico somente pelo exame da bursa atrofiada. Outras doenças que cursam com alterações similares, como a doença de Marek, micotoxicoses, coccidioses, síndrome hemorrágica, hepatite por corpúsculos de inclusão e bronquite infecciosa, devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.

Pela grande capacidade de disseminação do IBDV, as medidas de prevenção e controle dessa enfermidade requerem uma abordagem bem coordenada, envolvendo medidas de biossegurança e vacinação. No ambiente, o vírus pode persistir por quatro meses. A vacinação deve ser utilizada para proteger os frangos nas primeiras semanas de vida. Para garantir altos títulos de anticorpos passivos, as matrizes poedeiras devem receber vacinas inativadas com adjuvante oleoso quando completarem 18 semanas de vida, com revacinações anuais. Algumas vacinas são aplicadas pela via oral, adicionadas na água dos bebedouros. Os pintos são imunizados com uma vacina atenuada, iniciando a aplicação com uma ou duas semanas de vida, porém a proteção é comprometida nessas aves pela presença de imunidade passiva, que pode permanecer por quatro a sete semanas e neutralizar o vírus vacinal. A proteção dos frangos frente a cepas de alta virulência também pode ser comprometida quando os antígenos vacinais utilizam cepas altamente atenuadas. Por outro lado, a utilização de cepas pouco atenuadas pode não ser segura, e os animais apresentarem infecção subclínica, acompanhada de lesão na bursa e imunossupressão. Vacinas recombinantes estão em desenvolvimento, utilizando alguns poxvírus, herpesvírus (vírus da doença de Marek) e togavírus (vírus Semliki Forest) como vetores. Vacinas de subunidade, utilizando a proteína VP2 como antígeno, também estão sendo estudadas

e apresentaram uma resposta satisfatória. Vacinas de DNA também estão em fase de pesquisa e desenvolvimento. No entanto, nenhuma dessas vacinas está disponível no comércio.

7.4.2 Vírus da pancreatite necrótica infecciosa

A pancreatite necrótica infecciosa (*infectious necrotizing pancreatitis*, INP) é uma doença infecto-contagiosa de grande importância na produção de diferentes espécies de salmonídeos em diversos países da União Européia, Ásia, América do Norte e América do Sul. A doença foi descrita, pela primeira vez, nos EUA, em 1955, em trutas de água doce; porém, relatos compatíveis com a doença datam da década de 1940. Na Europa, a doença foi descrita na Inglaterra, em 1971, em trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

O agente etiológico da INP é um vírus não-envelopado, pertencente ao gênero *aquabirnavirus*, família *Birnaviridae*. Os isolados do vírus da INP (INPV) possuem uma grande variabilidade antigênica e podem ser classificados em dois sorogrupos imunologicamente distintos: sorogrupos A e B. A grande maioria dos isolados do vírus pertencem ao sorogrupo A, que possui, pelo menos, nove sorotipos com diferentes níveis de patogenicidade e virulência.

7.4.2.1 Epidemiologia

O INPV é transmitido horizontalmente, por meio de fezes, urina e secreções, e também verticalmente, por meio das ovas infectadas. Algumas espécies de aves e mamíferos aquáticos, caranguejos e protozoários podem servir como vetores mecânicos do vírus. Experimentalmente, a doença pode ser transmitida pela ingestão do vírus, imersão em água contaminada ou pela injeção do vírus nos salmões.

A doença ocorre com frequência em trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), trutas-brook (*Salvelinus fontinalis*), trutas-marrons (*Salmo trutta*), salmões do Atlântico (*Salmo salar*) e diversas outras espécies de salmões do oceano Pacífico (*Oncorhynchus* spp.).

7.4.2.2 Patogenia, sinais clínicos e patologia

A infecção *per se* dos salmões com o aquabirnavírus não é suficiente para causar a doença. A ocorrência de manifestações clínico-patológicas depende da cepa viral, do título do inóculo, das condições ambientais e da idade dos peixes. O efeito da densidade dos peixes na transmissão e ocorrência da doença ainda é controverso. A infecção pelo INPV em alevinos de salmonídeos cursa com alta morbidade e mortalidade. Além disso, desde a década de 1980, observou-se que a infecção também tem sido fatal em salmões com mais de dois anos de idade (juvenis). A morte geralmente sobrevém 2 a 3 meses após o contato ou transferência dos salmões com a água do mar. Os sinais da infecção pelo INPV caracterizam-se por um aumento repentino e progressivo na mortalidade diária de peixes, acompanhada de pigmentação escurecida, exoftalmia, distensão abdominal, hiperventilação, geralmente próxima à superfície, e natação errática, em espiral, sobre seu próprio eixo. A mortalidade total pode variar de menos de 10% até acima de 90%.

Além disso, é comum a infecção persistente e assintomática em salmões adultos. Nestes casos, o vírus encontra-se associado aos neutrófilos e monócitos da corrente sanguínea e do rim. O estado de portador cursa com redução do apetite e, conseqüentemente, com redução na produção. Além disso, a mortalidade em salmões com infecção assintomática é cinco vezes maior do que em salmões não-infectados. Acredita-se que aproximadamente 90% dos peixes que sobrevivem à infecção tornam-se portadores e mantêm o INPV por vários anos. No entanto, a persistência do vírus pode ser afetada pela espécie de salmonídeo infectado e parece diminuir gradativamente com o tempo e com a quantidade de anticorpos neutralizantes. Outras espécies de peixes também podem manter o INPV no ambiente aquático. Condições de estresse reativam a infecção nos peixes infectados de forma persistente.

A resistência à infecção depende da idade e da temperatura da água, e ocorre aproximadamente aos 1.500 graus-dias, valor esse obtido pela

multiplicação da idade do peixe (em dias), pela temperatura média da água (em °C) durante a sua vida. No entanto, salmões do oceano Atlântico, criados em cativeiro, são susceptíveis à infecção logo após a transferência da água doce para a água salgada, que ocorre aproximadamente aos dois anos de idade. A mortalidade é mais rápida e maior em temperaturas em torno de 10 a 14°C; em temperaturas acima de 14°C, a mortalidade é significativa, mas reduzida.

As lesões patológicas observadas na INP caracterizam-se por palidez hepática e esplênica; o estômago e o intestino encontram-se repletos de fluido mucóide; observam-se hemorragias petequiais ao longo do tecido pilórico e pancreático. As células acinares do pâncreas apresentam necrose intensiva, caracterizada por picnose, cariorrexia, inclusões intracitoplasmáticas e infiltração de macrófagos e células polimorfonucleares. O piloro, a ceca do piloro e também o intestino anterior apresentam necrose intensa. Há desprendimento do epitélio intestinal, o qual se combina com o muco para formar um exsudato catarral esbranquiçado. Observa-se também degeneração do tecido renal hematopoiético, tecido excretor e fígado.

7.4.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo INPV dos salmões baseia-se no isolamento viral em cultivo celular, seguido da identificação imunológica do vírus por meio de soroneutralização (SN), ELISA, imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX). Métodos moleculares de diagnóstico, como a RT-PCR, executadas diretamente em amostras clínicas, também têm sido desenvolvidos e apresentam alto grau de concordância e especificidade. Antígenos virais também podem ser detectados por meio de imunohistoquímica em tecidos preservados em formalina.

7.4.2.4 Controle e profilaxia

O controle da infecção se baseia na adoção de medidas profiláticas, para evitar a introdução do agente na criação, que consistem na obtenção de ovas provenientes de matrizes livres de INPV

e a utilização de água de boa qualidade (isto é, proveniente de riachos ou poços artificiais), na qual é impossível a introdução de salmonídeos (ou outras espécies de peixes) portadores do INPV. Deve-se também evitar condições de manejo estressantes. Em criatórios, águas contaminadas podem ser tratadas com cloro, ozônio e radiação ultravioleta, porém a eficácia desses tratamentos é influenciada por diversos fatores, como presença de matéria orgânica. Além disso, recomenda-se a desinfecção rotineira dos ovos com desinfetantes ionofóros tamponados.

A utilização de vacinas para o controle ainda é incipiente. Vacinas inativadas estimulam uma boa resposta imune quando administradas via injeção ou imersão, mas não conferem proteção quando administradas com o alimento ou por infiltração hiperosmótica. Vacinas vivas atenuadas apresentam problemas de ordem legal relacionados ao controle da disseminação do vírus e interferência com métodos de diagnóstico. Vacinas de subunidades e vacinas recombinantes estão sendo testadas para controle da INP, bem como o desenvolvimento de peixes geneticamente resistentes à infecção pelo INPV.

8 *Bornaviridae*

A família *Bornaviridae* é constituída por vírus RNA de fita simples e polaridade negativa que infectam vertebrados. O membro mais importante dessa família é o vírus da doença de Borna (BDV), que acomete principalmente os equinos e ovinos. A denominação da doença se refere à cidade alemã, onde vários cavalos morreram de doença neurológica em 1895. Esta enfermidade foi, então, denominada de doença de Borna (BD), e o agente identificado, em 1926, foi denominado vírus da doença de Borna (BDV). Nas últimas décadas, vírus com características semelhantes têm sido identificados como patógenos de humanos, porém ainda estão em processo de caracterização.

8.1 Classificação

A família *Bornaviridae* pertence à ordem *Mononegavirales*, juntamente com os vírus das famí-

lias *Filoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Paramyxoviridae*. A família *Bornaviridae* possui um único gênero, o *Bornavirus*, cujo único membro é o BDV. Existem diferentes isolados do BDV, obtidos de diferentes espécies e em diferentes locais. No entanto, a análise filogenética revela que esses isolados são altamente relacionados entre si e apresentam uma alta reatividade sorológica cruzada, justificando o seu agrupamento no mesmo gênero.

8.2 Propriedades gerais

Os bornavírus possuem vírions esféricos, envelopados, com 80 a 100 nm de diâmetro. Possuem uma molécula de RNA de fita simples, sentido negativo, de aproximadamente 8.9 kb como genoma. A superfície do envelope é recoberta por peplômeros de aproximadamente 7 nm. O núcleo dos vírions (nucleocapsídeo) parece não possuir uma forma bem definida. Ao contrário das outras famílias que compõem a ordem *Mononegavirales*, os bornavírus replicam no núcleo, apresentam unidades de transcrição sobrepostas e alguns transcritos sofrem processamento (*splicing*) pela maquinaria da célula hospedeira. As propriedades gerais dos bornavírus estão resumidas no Quadro 32.7.

O genoma dos bornavírus (RNA de polaridade negativa, 8.9 kb) apresenta seis ORFs, que estão divididas em três unidades de transcrição. As outras três ORFs são geradas por *splicing*. A ORF da RNA polimerase se localiza na região próxima

à extremidade 5'; a ORF da nucleoproteína está situada próxima à extremidade 3'. As proteínas codificadas pelas ORFs são: ORF 1 – nucleoproteína (p40), ORF 2 – p24 uma fosfoproteína (cofator da polimerase), ORF 3 – p10, uma proteína de 9 kDa cuja função é desconhecida, porém aparentemente é um regulador negativo da polimerase ou tem função na importação para o núcleo das demais proteínas virais; está em posição sobreposta a ORF 2; ORF 4 – proteína da matriz (p16) de aproximadamente 16 kDa; ORF 5 – glicoproteína de 56 kDa, e ORF 6 – RNA polimerase (p190). As ORFs 4, 5 e 6 são geradas de uma mesma unidade de transcrição, seja por sobreposição em diferentes fases de leitura seja por *splicing*.

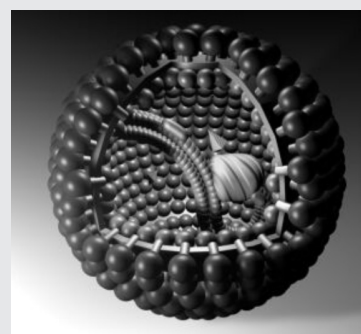
8.3 Ciclo replicativo

Os bornavírus são os únicos vírus RNA de polaridade negativa não-segmentados que replicam no núcleo das células hospedeiras. Estudos têm demonstrado que tanto o RNA de polaridade positiva como o RNA de polaridade negativa são encontrados no núcleo, porém em localizações distintas. Cadeias de RNA de polaridade positiva estão preferencialmente localizados próximos aos nucléolos, enquanto os de polaridade negativa podem ou não estar próximos aos nucléolo, sugerindo um papel dessas organelas na replicação do BDV.

Os bornavírus penetram na célula hospedeira por endocitose, seguida de fusão do envelope

Bornaviridae

- Vírions esféricos, com envelope (80-90 nm);
- Envelope com peplômeros (7 nm);
- Capsídeo sem morfologia definida;
- Genoma RNA fita simples, polaridade negativa, 8.9 kb;
- Genes sobrepostos; 6 ORFs;
- Alguns mRNAs sofrem *splicing*;
- Replicação do genoma ocorre no núcleo;
- Infecção *in vitro* é geralmente não-citolítica;
- Membro principal: vírus da doença de Borna (equinos).



Fonte: Dr W.Garten. Inst.Virol.Marburg.

Quadro 32.7. Propriedades biológicas e moleculares dos bornavírus. À direita, está uma ilustração esquemática de um vírion.

com a membrana endocítica. A gp-43 está presente no envelope e na superfície das células infectadas e provavelmente fusão. A gp-84 parece estar envolvida na ligação do vírus aos receptores celulares.

Os detalhes da replicação dos bornavírus não estão bem esclarecidos. Alguns pesquisadores sugerem que exista um mecanismo de regulação do genoma através de digestão enzimática na extremidade 5', envolvendo a deleção de partes do genoma para limitar a expressão gênica. Sugere-se que esta estratégia seja benéfica aos bornavírus, pois permitiria o estabelecimento de infecção persistente, sem determinar efeitos citolíticos.

8.4 Biologia e patogenia

O BDV infecta primariamente neurônios e células da glia, nas quais não produz efeito citopático aparente. Constitui-se, portanto, em um vírus neurotrópico. O BDV apresenta níveis de replicação e produção de progênie viral inferiores quando comparado com outros vírus. Outra característica importante desse vírus é a sua capacidade de permanecer no sistema nervoso central (SNC) de animais infectados em infecções persistentes.

8.5 Doença de Borna

A doença de Borna é uma enfermidade severa, de curso geralmente fatal, caracterizada pelo desenvolvimento de distúrbios nervosos em eqüinos e ovinos, causada pelo BDV. A enfermidade cursa com uma meningoencefalite não-supurativa. A importância dessa enfermidade tem aumentado nos últimos anos, pois uma série de estudos tem demonstrado uma associação do bornavírus com distúrbios neuropsiquiátricos.

A distribuição geográfica da infecção pelo BDV é desconhecida. A infecção natural tem sido descrita na Europa, na América do Norte e em parte da Ásia (Japão e Israel). No entanto, deve-se considerar que a falta de reagentes para diagnóstico certamente contribui para o pouco conhecimento sobre essa doença em muitos países. Assim, considera-se que esse vírus possa ter uma distribuição maior do que a relatada até o presente.

Originalmente, o BDV foi identificado como agente de enfermidade em eqüinos. No entanto, o vírus também tem sido isolado de ovinos, lhamas, felinos e bovinos. Várias espécies animais já foram infectadas experimentalmente, o que sugere que este vírus seja capaz de infectar virtualmente todos os animais de sangue quente, incluindo primatas. Anticorpos anti-BDV têm sido detectados tanto em animais como em humanos sem sinais clínicos, o que indica que as infecções subclínicas são, provavelmente, mais prevalentes do que as clínicas. De fato, acredita-se que a maioria das infecções pelo BDV em eqüinos são assintomáticas, pois anticorpos anti-BDV são frequentemente encontrados em animais sem histórico clínico da enfermidade.

Não se conhecem possíveis reservatórios naturais do BDV, nem a forma de transmissão.

O BDV penetra provavelmente pela via nasal, replica nos neurônios localizados próximos ao sítio de entrada e migra através de transporte axonal até o sistema nervoso central (SNC), provavelmente pelo sistema olfatório. No SNC, o BDV apresenta tropismo pelo sistema límbico, incluindo o hipocampo. O sistema límbico está envolvido na regulação da memória, das interações ambientais e das emoções e parece ter um papel importante em algumas distúrbios neuropsiquiátricos em humanos. Tardamente após a infecção, o BDV migra via transporte axonal anterógrado para o sistema nervoso periférico, infectando células como astrócitos, oligodendrócitos e as células de *Schwann*. Órgãos não-neurais podem ser infectados posteriormente. A presença de ácidos nucleicos e de proteínas do BDV em células mononucleares periféricas (PBMC) podem indicar uma disseminação pela via hematogênica.

A infecção experimental em roedores resulta em persistência viral e está associada com a presença do vírus na saliva, na urina e nas fezes. Levantou-se a hipótese de que roedores poderiam ser os hospedeiros naturais do agente. No entanto, o BDV ainda não foi demonstrado em infecções naturais em roedores.

Em eqüinos e em ovinos, a infecção é caracterizada por alterações comportamentais agressivas, que progridem para a paralisia e inanição em poucas semanas. A patogenia da infecção parece

estar ligada à doença mediada pelo sistema imunológico. Os sinais clínicos mais frequentemente observados em cavalos são: excitação, ataxia, postura anormal, opistótono, nistagmo, cegueira, paralisia e morte. Por outro lado, a infecção pode também ser assintomática, persistente ou crônica.

Roedores têm sido utilizados como modelo experimental para estudos de patogenia da infecção pelo BDV. Ratos adultos apresentam hiperatividade, que coincide com a presença de produtos virais em neurônios do sistema límbico e infiltração de células mononucleares no cérebro. Em animais que sobrevivem à infecção, embora a inflamação regride em algumas semanas, o vírus persiste e os animais podem apresentar diferentes sinais neurológicos associados com alterações no SNC. No entanto, quando ratos são infectados quando neonatos, a doença é caracterizada por crescimento retardado, distúrbios de comportamento e apetite depravado. Estes animais não são capazes de montar uma resposta imune celular contra o vírus. Primatas infectados experimentalmente apresentam distúrbios comportamentais nos aspectos social e sexual. Alguns destes apresentam relações anormais de dominância e não conseguem copular. Os macacos rhesus infectados experimentalmente se tornam inicialmente hiperativos e, posteriormente, apáticos e hipocinéticos.

O diagnóstico diferencial de doenças neurológicas em eqüinos deve, necessariamente, considerar a possibilidade de doença de Borna, sobretudo em áreas onde a doença já foi diagnosticada. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado com testes sorológicos, por imunofluorescência, *Western blot*, radioimunoprecipitação e ELISA.

9 Bibliografia consultada

- BOWDEN, T.J. et al. Experimental challenge of post-smolts with IPNV: mortalities do not depend on population density. *Journal of Fish Disease*, v.26, p.309-312, 2003.
- BOWDEN, T.J.; SMAIL, D.A.; ELLIS, A.E. Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Disease*, v.25, p.555-563, 2002.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Ebola Hemorrhagic Fever. **Atlanta, GA: CDC**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/ebola.htm>. Acesso em: 05 dez. 2006.
- CHISARI, F.V.; FERRARI, C. Viral Hepatitis. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.31, p.745-778.
- HOW, L.T.; BROKER, T.R. Small DNA Tumor Viruses. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.12, p.267-301.
- COLE, C.N. Polyomavirinae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.63, p.1997-2025.
- DOHERTY, P.C.; AHMED, R. Immune Responses to Viral Infection. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.7, p.143-161.
- FLINT, S.J. et al. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. 804p.
- GANEM, D. Hepadnaviridae and Their Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.85, p.2703-2737.
- GANEM, D.; SCHNEIDER, R.J. HEPADNAVIRIDAE: THE VIRUSES AND THEIR REPLICATION. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.36, p.1285-1321.
- GARCIA, J.; URQUHART, H.; ELLIS, A.E. Infectious pancreatic necrosis virus establishes an asymptomatic carrier state in kidney leukocyte of juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Disease*, v.29, p.409-413, 2006.
- LUKERT, P.D.; SAIF, Y.M. Infectious Bursal Disease. In: SAIF, Y.M. et al. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: IO: Iowa State University Press, 2003. Cap.6, p.161-179.
- MATSUI, S.M.; GREENBERG, H.B. Astroviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.26, p.811-824.
- McALLISTER, P.E. Salmonid fish viruses. In: STOSKOPF, M.K. (ed). **Fish medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1993. Cap.38, p.380-408.
- MURPHY, F.A. et al. Arenaviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap 32, p. 485-464.
- MURPHY, F.A. et al. Astroviridae. In: _____. **Veterinary virology**, 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap 37, p.543-546.
- MURPHY, F.A. et al. Birnaviridae. In: _____. **Veterinary virology**, 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap 25, p.405-409.
- MURPHY, F.A. et al. Birnaviridae. In: _____. **Veterinary virology**.

3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap 25, p.405-409.

MURPHY, F.A. et al. Filoviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap 28, p.447-453.

MURPHY, F.A. et al. Papovaviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap 20, p.335-342.

MURRAY, A.G.; BUSBY, C.D.; BRUNO, D.W. Infectious pancreatic necrosis virus in scottish atlantic salmon farms, 1996-2001. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.455-460, 2003.

PETERS, C.J. et al. Filoviridae: marburg and ebola viruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.39, p.1161-1176.

PETERS, C.J.; LEDUE, J.W. An introduction to Ebola: the virus and the disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.179, p.ix-xvi, 1999.

PETERSON, A.T.; BAUER, J.T.; MILLS, J.N. Ecologic and geographic distribution of filovirus disease. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.40-47, 2004.

ROBERTS, R.J.; PEARSON, M.D. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.28, p.383-390, 2005.

SHOPE, R.E.; MEEGAN, J.M. African hemorrhagic fevers caused by marburg and ebola viruses. In: EVANS, A.S.; KASLOW, R.A. (eds). **Viral infections of humans: epidemiology and control**. 4.ed. New York: Plenum, 1997. Cap.5, p.139-148.

SOUTHERN, P.J. Arenaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds). **Fields virology**. 3.ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996. Cap.49, p.1505-1519.

VAN DEN BERG, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. **Avian Pathology**, v.29, p.175-194, 2000.

ZINKERNAGEL, R.M. Virus-induced immunopathology. In: NATHANSON, N. (ed). **Viral pathogenesis**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. Cap.8, p.163-179.

ABREVIATURAS E SIGLAS

A

AAV: vírus adeno-associado.

AcM: anticorpo monoclonal.

ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpos.

ADE: infecção mediada por anticorpos.

AdV: adenovírus.

ADV: vírus da doença de Aujeszky (herpesvírus suíno 1, SuHV-1 ou vírus da pseudorraiva, PRV).

AE: encefalomielite das aves.

AEC: aminoetilcarbazol.

AEV: vírus da encefalomielite das aves.

AGID: imunodifusão em ágar.

AHSV: vírus da peste eqüina.

AIDS: síndrome da imunodeficiência humana adquirida.

AIG: anemia infecciosa das galinhas.

AiV: vírus Aichi.

AIV: vírus da influenza aviária.

AKAV: vírus Akabane.

AIHV-1: herpesvírus alcefaline (vírus da febre catarral maligna, forma africana).

ALT: alanina aminotransferase.

ALV: vírus da leucose aviária.

AMDV: vírus da doença das martas *Aleutian*.

AmPV: metapneumovírus aviário.

ANV: vírus da nefrite aviária.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AP: fosfatase alcalina.

APC: célula apresentadora de antígeno.

APMV: paramixovírus aviário.

APV: pneumovírus aviário.

ARPyV: poliomavírus de ratos atímicos.

ARV: ortoreovírus de aves.

ARV-A: aquareovírus A.

AS: ácido siálico.

ASF: peste suína africana.

ASFV: vírus da peste suína africana.

ATP: adenosina trifosfato.

ATPase: atividade de hidrólise de ATP.

B

B19: parvovírus humano.

BAdV: adenovírus bovino.

BALT: tecido linfóide associado aos brônquios.

BCG: bacilo de Calmette e Guérin.

BCoV: coronavírus bovino.

BCR: receptor de linfócitos B.

BD: doença de Borna.

BDV: vírus da doença da fronteira (ovinos) e também vírus da doença de Borna (eqüinos).

BEFV: vírus da febre efêmera dos bovinos.

BEV: enterovírus bovino.

BeV: vírus Berne.

BFV: vírus da doença das penas e bicos dos psitacídeos.

BHK-21: célula de rim de *hamster* jovem.

BHM: mamilite herpética bovina.

BIV: vírus da imunodeficiência bovina.

BKPyV: vírus BK.

BKV: poliomavírus humano

BLV: vírus da leucose bovina.

BoHV: herpesvírus bovino (1, 2, 4 e 5).

BoRV: rinovírus bovino.

BOTV: vírus Bunyamwera.

bPI3V: vírus da parainfluenza bovina tipo 3.

BPSV: vírus da estomatite papular bovina.

BPV (1-7): papilomavírus bovino.

BPV: parvovírus bovino.

BPV-1: papilomavírus bovino tipo 1.

BPyV: poliomavírus bovino.

BRSV: vírus respiratório sincicial bovino.

BRV: ortoreovírus de babuínos.

BRV: rotavírus bovino.

BrV: vírus Breda.

BSL: nível de biossegurança.

BT: língua azul.

BT: linhagem celular de corneto nasal bovino.

BToV: torovírus bovino.

BTV: vírus da língua azul.

BVDV: vírus da diarreia viral bovina.

C

C: capsídeo.

CA: proteína do capsídeo.

CaCV: circovírus do canário.

CAdV: adenovírus canino.

CAdV-1: adenovírus canino tipo 1.

CAdV-2: adenovírus canino tipo 2.

CAEV: vírus da artrite-encefalite caprina.

CaHV: herpesvírus canino.

Cap: 7-metil-guanina ligada na extremidade 5' do RNA.

CAR: receptor do adenovírus e do vírus *Coxsackie*.

CAV: vírus da anemia aviária.

CAV9: *Coxsackievirus A9*.

ccc: círculo covalentemente fechado.

CCHF: febre hemorrágica da Criméia-Congo.

CCHFV: vírus da febre hemorrágica Criméia-Congo.

CCoV: coronavírus canino.

CD4: marcador de linfócitos T auxiliares (Th).

CD8: marcador de linfócitos T citotóxicos (Tc).

Cdk: quinases dependentes de ciclinas.

cDNA: DNA complementar

CDV: vírus da cinomose.

CEF: cultivo primário de embrião de galinha.

CEK: célula de embrião de pinto.

CF: fixação do complemento.

ChPV: *Chanffinch* papilomavírus.

ChPV: parvovírus das galinhas.

ChPVs: cordopoxvírus.

CID: coagulação intravascular disseminada.

CLP: partícula semelhante ao *core* ou núcleo viral.

CMV: citomegalovírus humano.

CnMV: vírus minuto dos cães.

CNPV: poxvírus do canário.

COCV: vírus Cocal.

CoCV: coronavírus canino.

COPV: papilomavírus oral canino.

Cp: citopático.

CPE: efeito citopático.

CpHV: herpesvírus caprino.

CPIV-2: vírus da parainfluenza canina tipo 2.

CPSH: síndrome cardiopulmonar por hantavírus.

CPV: parvovírus canino.

CR1, 2 e 3: regiões conservadas.

CRCV: coronavírus canino respiratório.

Cre: sequência regulatória *cis-acting*.

CRFK: célula de linhagem de rim felino.

CRIB: célula de linhagem de rim bovino resistente ao BVDV.

cRNA: RNA complementar.

CRPV: papilomavírus dos coelhos cauda-de-algodão.

CRSV: vírus respiratório sincicial caprino.

CRV: reovírus canino.

CSF: peste suína clássica.

CSFV: vírus da peste suína clássica.

CTFV: vírus da febre dos carrapatos do Colorado.

CTL: linfócito T citotóxico.

CV-1: célula de linhagem de primatas.

CV-B5: *Coxsackievirus* B5 de humanos.

D

Da: dalton.

DAB: diaminobenzidina.

DAdV: adenovírus de patos.

DBP: proteína de ligação ao DNA.

DC: célula dendrítica.

DeAdV: adenovírus de cervídeos.

DHBV: vírus da hepatite B dos marrecos.

DHOV: vírus Dhori.

DM: doença das mucosas.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dNTP: desoxirribonucleotídeo.

DPV: papilomavírus de cervídeos.

DR: repetição direta.

ds: cadeia dupla (*double stranded*).

dsRNA: RNA de fita dupla.

DUGV: vírus de Dugbe.

dUTPase: enzima que desdobra o nucleotídeo UTP.

E

E (early): genes de expressão inicial (ou precoce).

E1 a E7: proteínas iniciais.

EAdV: adenovírus eqüino.

EAV: vírus da arterite eqüina.

EBHSV: vírus da doença hemorrágica das lebres pardas européias.

EBTr: células de linhagem de traquéia de feto bovino.

EBV: vírus Epstein-Barr.

ECMV: vírus da encefalomiocardite.

ECP: efeito citopatogênico ou citopático.

ED: célula de derme eqüina.

EDS: síndrome da queda da postura.

EEE: encefalite eqüina do leste.

EEEV: vírus da encefalite eqüina do leste.

EEPV: papilomavírus do alce europeu.

EEV: partícula vírica envelopada extracelular.

EEV: vírus da encefalose eqüina.

EHD: doença epizootica hemorrágica dos cervos.

EHDV: vírus da doença epizootica hemorrágica dos cervos.

EHV: herpesvírus eqüino 1, 3 e 4.

EIAV: vírus da anemia infecciosa eqüina.

eIF-2: fator eucariota de iniciação.

EITB: ensaio imunoenzimático em *blot*.

EIV: vírus da influenza eqüina.

ELISA: ensaio imunoenzimático.

EMCV: vírus da encefalomiocardite murina.

EqPV: papilomavírus eqüino.

EqRV: rinovírus eqüino.

ERBV: vírus da rinite eqüina B.

ETF: fator de transcrição dos genes iniciais.

EToV: torovírus eqüino.

EVA: arterite viral eqüina.

F

F: proteína de fusão.

FA: Fosfatase alcalina

FAdV: adenovírus aviário.

FAIDS: síndrome da imunodeficiência felina adquirida.

FAO: seção da ONU responsável pela agricultura e alimentos.

Fc: fixação do complemento.

FCoV: coronavírus entérico felino.

FCV: calicivírus felino.

FDPV: papilomavírus felino.

FeCoV: vírus da peritonite infecciosa felina.

FeHV: herpesvírus felino.

FeLV: vírus da leucemia felina.

FIP: peritonite infecciosa dos felinos.

FIPV: vírus da peritonite infecciosa felina.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

FIV: vírus da imunodeficiência felina.

FluAV: Influenzavírus A.

FluBV: Influenzavírus B.

FluCV: Influenzavírus C.

FMD: febre aftosa.

FMDV: vírus da febre aftosa.

FMO: falência múltipla dos órgãos.

FOCMA: antígeno do oncovírus felino associado à membrana.

FPL: panleucopenia felina.

FPLV: vírus da panleucopenia felina.

FVR: rinotraqueíte viral felina.

FWPV: vírus da bouba aviária.

G

GAdV: adenovírus caprino.

GaHV-1, 2 e 3: herpesvírus galídeo tipos 1, 2 e 3.

gB (C etc.): glicoproteínas do envelope.

GBK: célula de rim bovino.

GDD: glicina-asparagina-asparagina.

GEH: gastroenterite hemorrágica.

GoAdV: adenovírus de gansos.

GoCV: circovírus dos gansos.

GP: glicoproteína.

GSHV: vírus da hepatite B dos esquilos.

GTPV: poxvírus dos caprinos.

H

H: hemaglutinina.

HA: teste de hemaglutinação.

HA: hemaglutinina.

HAD: hemadsorção.

HaOPV: papilomavírus oral do *hamster*.

HaPV: polyomavírus de *hamsters*.

HAV: vírus da hepatite A humana.

HBV: vírus da hepatite B humana.

HCC: carcinoma hepatocelular.

HCMV: citomegalovírus humano (HHV-5).

HCoV: coronavírus humano.

HCV: vírus da hepatite C.

HE: hemaglutinina-esterase.

HEF: glicoproteína multifuncional no envelope.

HeLA: células de linhagem humana.

HEV: vírus da encefalomielite hemaglutinante dos suínos.

HeV: vírus Hendra.

HFRS: febre hemorrágica com síndrome renal.

HHV: herpesvírus humanos tipos 1-8.

HI: inibição da hemaglutinação.

HIC: hepatite infecciosa canina.

HIRRV: rabdovírus *hirame*.

HIV: vírus da imunodeficiência humana.

hPEV1: parechovírus humano 1.

hPIV: vírus da parainfluenza humana

HPS: síndrome pulmonar por hantavírus.

HPV: papilomavírus humanos.

HRPO: *horseradish* peroxidase.

hRSV: vírus sincicial respiratório humano.

HRV: rinovírus humano.

HSV: vírus do herpes simplex (HSV-1 e HSV-2).

HT 29: célula de tumor retal humano.

HTLV: vírus da leucemia de linfócitos T.

HTNV: vírus Hantaan ou hantavírus.

HToV: torovírus humano.

HuCoV: coronavírus humano.

HuCV: calicivírus clássicos humanos.

HV: herpesvírus.

HVT: herpesvírus de perus.

I

IBDV: vírus da doença de Gumboro.

IBR: rinotraqueíte infecciosa bovina.

IBRS-2: célula de rim suíno (Instituto Biológico de São Paulo).

IBRS2: célula de linhagem de rim suíno.

IBRV: vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BoHV-1).

IBV: vírus da bronquite infecciosa aviária.

ICAM-1: molécula de adesão intercelular tipo 1.

IcHV-1: herpesvírus do *catfish*.

ICPs: polipeptídeos virais produzidos em células infectadas por herpesvírus.

ICQ: imunocitoquímica.

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus.

ID: intestino delgado.

ID₅₀: dose infectiva para 50% dos cultivos celulares.

IDGA: imunodifusão em ágar.

IE: genes de transcrição imediata.

IFA: imunofluorescência.

IFD: imunofluorescência direta.

IFI: imunofluorescência indireta.

IFN: interferon.

IFN- α : interferon alfa.

IFN- β : interferon beta.

IFN- γ : interferon gama.

Ig: imunoglobulina.

IgA: imunoglobulina A

IHC: imunoistoquímica.

IHNV: vírus da necrose hematopoiética infecciosa.

IHQ: imunoistoquímica.

IL: interleucinas.

ILTV: vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves.

IMV: partícula vírica intracelular madura.

IN: integrase.

INPV: vírus da pancreatite necrótica infecciosa.

IPB: balanopostite pustular bovina.

IPIC: índice de patogenicidade intracerebral.

IPV: vulvovaginite pustular bovina.

IPX: imunoperoxidase.

IR: repetição invertida.

IR: região intergênica.

IRES: sítio interno de reconhecimento pelos ribossomos.

ISAV: vírus da diarreia infecciosa do salmão.

ISCOM: complexo imunoestimulante.

ISH: hibridização *in situ*.

ITR: repetição terminal invertida.

IV: vírus da doença de Ibaraki.

J

JCV: poliomavírus humano.

JEV: vírus da encefalite japonesa.

JSRV: vírus da adenomatose pulmonar dos ovinos (retrovírus Jaagsiekte).

JUNV: vírus Junin.

K

kb: quilobase.

kbp: quilopares de bases.

kDa: quilodalton.

KDV: vírus kadipiro.

KIR: receptor inibidor de morte celular.

KPyV: Kilham poliomavírus.

L

L: *large* (grande).

L: polimerase.

L (*late*): genes de expressão tardia.

LACV: vírus La Crosse.

LASV: lassavírus de roedores e humanos.

LAT (LTR): transcrito associado à latência.

LC: célula de Langerhans.

LCMV: vírus da coriomeningite linfocítica.

LCR: região longa de controle.

LD₅₀: dose letal para 50% dos animais.

LDEV: vírus elevador da lactato desidrogenase.

LDL: lipoproteína de baixa densidade.

LNyV: vírus da necrose amarela da alface.

LPS: lipopolissacarídeo.

LPyV: poliomavírus linfotrópico.

LSD: doença da pele nodulosa (*lumpy skin disease*).

LSDV: vírus da LSD.

LT: laringotraqueíte infecciosa das galinhas.

IT: antígeno T grande.

LTR: região longa terminal.

LTR: transcrito relacionado com a latência.

M

M: médio (*medium*).

M: proteína da matriz.

M1: proteína principal da matriz.

M2: proteína com atividade de canal de íons.

MA: proteína da matriz.

MA-104: células de rim de macaco.

MAC: complexo de ataque à membrana.

MACV: vírus Machupo.

MALT: tecido linfóide associado com mucosas.

MARC145: linhagem derivada da MA104.

MCF: febre catarral maligna.

MCF-AO: febre catarral maligna associada a ovinos.

MCFV: vírus da febre catarral maligna.

MD: doença de Marek.

MDBK: célula de linhagem de rim bovino.

MDCK: célula de linhagem de rim canino.

mDCs: células dendríticas mielóides.

MDCT-RP19: linhagem fibroblastóide.

MDPV: parvovírus dos patos Muscovy.

MDV: vírus da doença de Marek (GaHV-2).

ME: microscopia eletrônica.

MeHV-1: herpesvírus melagridis tipo 1.

MEV: vírus da enterite das martas.

MHC: complexo maior de histocompatibilidade.

MHC-I: complexo maior de histocompatibilidade do tipo I.

MHC-II: complexo maior de histocompatibilidade tipo II.

MHV: vírus da hepatite murina.

miRNA: micro RNAs com atividade interferente.

MLV: vírus da leucemia murina.

MMTV: vírus do tumor mamário do camundongo.

MNPV: papilomavírus dos *Mastomys natalensis*.

MNT: teste de neutralização viral em camundongos.

MOCV: vírus do *Moluscum contagiosum*.

MPtV: vírus pneumotrópico dos murinos.

mRNA: RNA mensageiro.

mRNAs_g: RNA subgenômico.

MRV: ortoreovírus de mamíferos.

mT: antígeno T médio.

MuLV: vírus da leucemia murina.

MV: vírus do sarampo.

MVEV: vírus Murray Valley.

MVM: vírus minuto dos camundongos.

MVV: vírus Maedi-Visna.

MYXV: vírus do mixoma dos coelhos.

N

NA: neuraminidase.

NC: proteína do nucleocapsídeo.

NCP: não-citopático.

ND: doença de Newcastle.

NDV: vírus da doença de Newcastle.

NiPV: vírus Nipah.

NK: células *natural killer*.

NLS: sinais para localização nuclear.

nm: nanômetro.

NP (ou N): nucleoproteína ou proteína do nucleocapsídeo.

NS: proteína não-estrutural.

NSD: doença das ovelhas de Nairobi.

NSDV: vírus da doença das ovelhas de Nairobi.

NSp: proteínas não-estruturais.

nt: nucleotídeo.

O

OAdV: adenovírus ovino.

OE: ovo embrionado.

OIE: Escritório Internacional das Epizootias.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

OP: fluido esofágico-faríngeo.

OPC: carcinoma pulmonar dos ovinos.

OPPV: vírus da pneumonia progressiva dos ovinos.

ORF: fase aberta de leitura.

ORFV: vírus do ectima contagioso dos ovinos.

ORI: origem de replicação.

ORSV: vírus respiratório sincicial ovino.

OvHV-2: herpesvírus ovino tipo 2.

OvPV: papilomavírus ovino.

P

PA: polimerase ácida.

PAdV: adenovírus suíno.

PAGE: eletroforese gel de poliacrilamida.

PANAFTOSA: Centro Pan-americano de Febre Aftosa.

Pb: pares de bases.

PB1: polimerase básica 1.

PB2: polimerase básica 2.

PBMC: células mononucleares do sangue periférico.

PBS: sítio de ligação do *primer*.

PCNA: fator celular de processividade do complexo de replicação.

PCR: reação da polimerase em cadeia.

PCV-1: circovírus suíno tipo 1.

PCV-2: circovírus suíno tipo 2.

pDCs: células dendríticas plasmacitóides.

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas.

PEDV: vírus da diarreia epidêmica dos suínos.

PEMSV: vírus da síndrome de mortalidade de galinhas.

PePV: papilomavírus dos psitacídeos.

PEV: enterovírus suíno.

PFU: unidades formadoras de placas.

pgRNA: RNA pré-genômico.

PhAdV: adenovírus de faisões.

PhCoV: coronavírus de faisões.

PhDV: morbilivírus das focas.

PI: persistentemente infectado.

PiCV: circovírus dos pombos.

PIVs: vírus da parainfluenza.

PK: células de rim suíno.

PK15: célula de linhagem de rim suíno.

PKR: proteína quinase R.

PLSD: *pseudo lumpy skin disease*.

PML: leucoencefalopatia progressiva multifocal.

polyA: sequência de adeninas.

PoV: poliomavírus de camundongos.

PoV: poliomavírus.

PoxV: poxvírus.

PPRV: vírus da peste dos pequenos ruminantes.

PPT: trato de polipurina.

PpV: papilomavírus.

PPV: parvovírus suíno.

PR: protease.

PRA: ensaio de redução de placa.

pRB: proteína do retinoblastoma.

PRCoV: coronavírus respiratório dos suínos.

PRRSV: vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos.

PRV: vírus da pseudorraiva (SuHV-1).

PsPV: papilomavírus dos cetáceos.

PToV: torovírus suíno.

pTP: precursora da proteína terminal.

PTV: teschovírus suíno 1.

PV: poliovírus.

PYDV: vírus do tomate pequeno amarelo.

PyV: poliomavírus de camundongos.

R

RabV: vírus da raiva.

Rb: produto do gene do retinoblastoma.

RdRp: RNA polimerase dependente de RNA.

RE: retículo endoplasmático.

REA: análise de restrição enzimática.

RER: retículo endoplasmático rugoso.

RFFIT: técnica de inibição de focos fluorescentes.

RFLP: polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição.

RFV: vírus do fibroma dos coelhos.

RHDV: vírus da doença hemorrágica dos coelhos.

RhPV: parvovírus do macaco *rhesus*.

RI: molécula intermediária de replicação.

RIA: radioimunoensaio.

RIP: radioimunoprecipitação.

RK13: células de linhagem de rim de coelho.

RNA: ácido ribonucléico.

RNApolIII: RNA polimerase II.

RNase H: ribonuclease H.

RNase: ribonuclease.

RNP: ribonucleoproteína.

RPA: proteína replicativa A.

RPM: rotações por minuto.

RPV: parvovírus do mão-pelada (*raccoon*).

RPV: vírus da peste bovina.

RR: ribonucleotídeo redutase.

RRE: elemento responsivo ao Rev.

RRV: vírus Ross River.

RS: Rio Grande do Sul.

RSV: vírus do sarcoma Rous.

RSVs: vírus respiratórios sinciciais.

RT: transcriptase reversa.

RT-PCR: transcrição reversa seguida de PCR.

RVF: febre do vale Rift.

RVFV: vírus da febre do vale Rift.

S

S: pequeno (*small*).

SA-12: vírus símio 12.

SABV: vírus sabiá.

SaHV-2: herpesvírus saimiri tipo 2.

SARS-CoV: coronavírus causador da pneumonia asiática, SARS.

SAT: *South African Territory* 1, 2 e 3.

SAV: adenovírus suíno.

SCR: sequência repetida consenso.

SDNS: síndrome da dermatite e nefropatia suína.

SFV: vírus Semliki Forest.

SH: proteína hidrofóbica pequena.

SHFV: vírus da febre hemorrágica dos símios.

SHS: síndrome da cabeça inchada.

SI: influenza suína.

SIN: vírus Sindbis.

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

SIV: vírus da influenza suína (também vírus da imunodeficiência dos símios).

SK6: células de linhagem de rim suíno.

SLEV: vírus da encefalite Saint Louis.

SMDS: síndrome multissistêmica do desmame.

SMSV: vírus dos leões-marinhos de San Miguel.

SN: soroneutralização.

SNC: sistema nervoso central.

SPA: adenomatose pulmonar dos ovinos.

SPF: livres de patógenos específicos.

SPV: parvovírus dos símios.

SRLV: lentivírus dos pequenos ruminantes.

SRSV: vírus pequenos arredondados.

ss: cadeia simples (*single stranded*).

ssRNA: RNA de fita simples.

sT: antígeno T pequeno.

ST: linhagem celular de testículo suíno.

SToV: torovírus suíno.

SU: proteína de superfície.

SuHV: herpesvírus suíno.

SV-40: vírus símio 40.

SVCV: vírus da viremia primaveril das carpas.

SVDV: vírus da doença vesicular dos suínos.

SVEV: vírus do exantema vesicular dos suínos.

SwPV: poxvírus suíno.

T

TAdV: adenovírus de perus.

TANV: vírus Tanapox.

Taq: polimerase do organismo *Thermophilus aquaticus*.

TAS: sequência associada à transcrição.

TAstV: astrovírus de perus.

TBEV: vírus da encefalite transmitida por carrapatos.

TBP: proteína de ligação ao TATA box.

Tc: linfócito T citotóxico.

TCID₅₀: dose infectiva para 50% dos cultivos celulares.

TCoV: coronavírus dos perus.

TCR: receptor de linfócitos T.

TfR: receptor da transferrina.

TGE: gastroenterite transmissível dos suínos.

TGEV: vírus da gastroenterite transmissível dos suínos.

TGF: fator de crescimento tumoral.

TGI: trato gastrointestinal.

Th: linfócito T auxiliar (helper).

THOV: vírus Thogoto de carrapatos.

TIC: traqueobronquite infecciosa canina.

TIF: fator ativador dos genes alfa.

TK: timidina quinase.

TM: proteína transmembrana.

TNF: fator de necrose tumoral.

TOC: cultivo de anel da traquéia.

TP: proteína terminal.

TRHV: vírus da rinotraqueíte dos perus.

tRNA: RNA transportador.

TRS: sequência de regulação da transcrição.

TS: mutantes sensíveis à temperatura.

TTE: trifuorotricloroetano.

TTV: circovírus humano (torquetenovírus).

TV-2: vírus Tellina.

U

UH: unidade hemaglutinante.

UL: região única longa.

UL(n): proteína cujo gene está na região UL.

US: região única curta.

UTR: região não-traduzida.

UV: ultravioleta.

V

VAP: proteína viral de ligação.

VCAM-1: molécula de adesão de células vasculares tipo 1.

VEE: encefalite eqüina venezuelana.

VEEV: vírus da encefalite eqüina venezuelana.

VERO: célula de rim de macaco-verde-africano.

VESV: vírus do exantema vesicular dos suínos.

VHSV: vírus da septicemia hemorrágica.

VIAA: antígeno associado com infecção viral.

VLDL-R: lipoproteína de baixíssima densidade.

VLP: partícula semelhante ao vírion.

VP1, 2 e 3: proteínas do capsídeo.

VP-16: transativador dos genes alfa dos herpesvírus (o mesmo que alfa-TIF).

VPg: proteína terminal.

VPs: proteínas virais.

vRNA: RNA genômico.

VS: estomatite vesicular.

VSAV: vírus da estomatite vesicular Alagoas.

VSIV: vírus da estomatite vesicular Indiana.

VSNJV: vírus da estomatite vesicular New Jersey.

VSV: vírus da estomatite vesicular.

VV: vírus da vaccinia.

VWD: síndrome do vômito e definhamento.

VZV: vírus da varicela-zoster (HHV-3)

W

WB: *Western blot*.

WBV: vírus Wesselbron.

WDSV: vírus do sarcoma dermal de Walleye.

WEE: encefalite eqüina do oeste.

WEEV: vírus da encefalite eqüina do oeste.

WHV: vírus da hepatite B das marmotas.

WNV: vírus do Nilo Ocidental

Y

YFV: vírus da febre amarela.

YMTV: atapox dos macacos.

YTAV: vírus *yellowtail ascites*.

GLOSSÁRIO

Ácido nucléico: molécula de ácido deoxirribonucléico (DNA) ou ácido ribonucléico (RNA).

Ácido siálico: sacarídeo composto por nove carbonos, encontrado em glicoproteínas e glicolípídios de membranas celulares. É utilizado como receptor por alguns vírus.

Adjuvante: substância ou formulação utilizada em vacinas não-replicativas para potencializar o efeito imunoestimulante do antígeno.

Adsorção: etapa inicial do ciclo replicativo dos vírus, na qual os vírions se ligam aos receptores celulares.

Aglutinação em látex: técnica de detecção de antígeno ou anticorpos que utiliza microesferas de látex como suporte para a imobilização da reação.

Ambissense: molécula de RNA que contém informação genética tanto no sentido do genoma quanto no sentido antígenômico.

Amostra viral: vírus de uma determinada espécie viral que foi isolado e não caracterizado. Os termos *cepa* e *isolado* também são utilizados.

Amplicon: segmento de DNA amplificado por PCR. Também chamado de produto de PCR.

Análise de restrição: análise comparativa de moléculas de DNA com base no tamanho dos fragmentos gerados pela clivagem por enzimas de restrição (endonucleases).

Anterógrado: relativo à direção do transporte neuronal: do corpo neuronal para as extremidades dos axônios ou dendritos.

Anticorpos: classe de globulinas plasmáticas com função de ligação a determinantes antigênicos. Também chamados de imunoglobulinas.

Anticorpos maternos: anticorpos recebidos da mãe através da placenta, pelo colostro/leite ou pela gema do ovo.

Anticorpos monoclonais: população de anticorpos altamente específicos e homogêneos, produzidos por clones de células híbridas (híbridomas) obtidas pela fusão entre linfócitos B e células de mieloma.

Anticorpos policlonais: população heterogênea de anticorpos produzidos por um animal em resposta a um determinado antígeno. São produtos de secreção de inúmeros clones diferentes de linfócitos B (plasmócitos).

Anticorpo primário: anticorpo específico para o antígeno de interesse, utilizado em técnicas de detecção de antígenos.

Anticorpo secundário: anticorpo contra imunoglobulinas (anti-Ig) de determinadas espécies animais, utilizado em técnicas de detecção de antígenos.

Antígeno: macromolécula capaz de se ligar especificamente aos receptores de células do sistema imunológico.

Antígeno T: proteína complexa multifuncional dos poliomavírus.

Antigenômico: molécula de ácido nucléico com sentido complementar (inverso) ao genoma.

Anti-soro: soro de animal que contém anticorpos, geralmente em altos títulos, contra um determinado antígeno ou agente.

Antissense: molécula de ácido nucléico cuja sequência de nucleotídeos é complementar (sentido contrário) a outra determinada molécula.

Aparelho de Golgi (complexo de Golgi): organela citoplasmática vesicular em cujo lúmen ocorrem modificações químicas de proteínas e metabolismo de lipídios. O aparelho de Golgi é responsável pelo direcionamento de proteínas e outras macromoléculas às diferentes organelas da célula e também para exportação.

Apatogênico: agente não-patogênico ou atenuado.

Apoptose: mecanismo de morte celular desencadeado por uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos, que cursa com ativação de vários genes e culmina com a fragmentação do DNA celular. Também denominada *morte celular programada*.

Aptidão biológica: conjunto de características fenotípicas que favorecem a replicação e perpetuação de um agente em um determinado ambiente biológico.

Arbovirose: infecção vírica transmitida por artrópodes (insetos).

Arbovírus: vírus transmitidos primariamente por artrópodes (insetos).

Área livre: área ou região que não possui um determinado agente etiológico.

Atenuação: redução (ou abolição) da patogenicidade de um agente.

Atenuação da transcrição: redução da eficiência de transcrição à medida que o complexo enzimático avança ao longo da molécula molde.

Atenuado: agente etiológico com patogenicidade reduzida.

Ativador promíscuo: fator de transcrição (ou ativação) que se liga em seqüências presentes em uma grande variedade de promotores, ativando a transcrição dos respectivos genes.

Atividade hemaglutinante: atividade de aglutinar eritrócitos animais.

ATPase: enzima com atividade de desdobramento de ATP para o fornecimento de energia para processos biológicos.

Autócrina: ação de uma substância na própria célula que a produz.

Bacteriófago: vírus que infecta bactérias.

Balística: metodologia de introdução de macromoléculas em organismos uni ou multicelulares por meio de projéteis impulsionados por um equipamento apropriado.

Barreira sanitária: conjunto de medidas utilizadas em zonas limítrofes para impedir a introdução de agentes patogênicos em determinadas áreas ou populações.

Base nitrogenada: componente dos nucleotídeos que compõem o DNA e RNA. Adenina, timina (uracil), citosina e guanina.

BCR: receptor de linfócitos B.

Brotamento: mecanismo de aquisição do envelope viral, no qual o nucleocapsídeo projeta-se através de membranas celulares.

Bursa de Fabricius: órgão linfóide primário das aves que controla o desenvolvimento e maturação de linfócitos B.

Cadeia complementar: molécula de ácido nucléico cuja seqüência de nucleotídeos é exatamente complementar a de outra molécula, de acordo com o pareamento de bases Watson-Crick (A-T, C-G).

Cadeia do processo infeccioso: série de etapas que ocorrem sequencialmente e continuamente na história natural dos agentes infecciosos na natureza.

Cadeia lagging: molécula de DNA sintetizada descontinuamente.

Cadeia leading: molécula de DNA sintetizada continuamente.

Cap: guanina metilada na posição 7, com orientação inversa, incorporada na extremidade 5' de RNAs mensageiros de eucariotas e que serve de sinal para o reconhecimento e tradução pelos ribossomos. Alguns *cap* possuem a segunda e terceira bases também metiladas.

Capa flogística: camada fina de leucócitos que se forma entre a coluna de eritrócitos e de plasma após centrifugação de sangue integral não-coagulado.

Capsídeo: camada protéica que reveste externamente o genoma viral.

Capsômero: unidade estrutural do capsídeo; aparece como projeção ou depressão na superfície dos vírions; pode ser formado por uma ou mais proteínas.

Caspase: família de proteases, algumas das quais envolvidas no mecanismo de apoptose.

Cauda poli A: seqüência de adeninas com extensão variável (tipicamente 100-200) adicionada à extremidade 3' de RNAs mensageiros celulares e virais. Parece conferir estabilidade ao mRNA e pode também ter participação no início da tradução.

Caveola: estrutura vesicular envolvida na internalização de macromoléculas e pequenas partículas por células eucariotas.

Célula apresentadora de antígeno (APC): célula que processa antígenos protéicos endógenos ou exógenos e apresenta a linfócitos T, induzindo a sua estimulação.

Célula de Langerhans: célula da linhagem monocítica que atua como APC na pele.

Célula de memória: célula linfóide (T ou B) originada a partir da expansão clonal estimulada pelo contato com o antígeno. Essas células possuem longa vida e podem ser reestimuladas quando o organismo é reexposto ao antígeno específico.

Célula dendrítica: população de células da linhagem mielóide ou linfóide que se distribuem no sangue e em tecidos linfóides e não-linfóides, cuja função principal é a captura e apresentação de antígenos aos linfócitos.

Célula efetora: denominação dada às células que atuam diretamente em determinada função.

Célula hospedeira: denominação genérica dada às células que servem de hospedeiras para a replicação de um vírus.

Célula interdigitante: célula da linhagem das células dendríticas que residem no baço.

Célula M: célula especializada na produção de muco que se localiza entre as células epiteliais da mucosa do intestino delgado.

Célula natural killer: célula da linhagem linfóide cuja função principal é lisar inespecificamente células tumorais e células infectadas por vírus, além de produzir citocinas. Também participa da lise celular dependente de anticorpos (ADCC).

Célula permissiva: célula que apresenta as condições intracelulares necessárias para a replicação viral.

Célula primária (cultivo primário): célula cultivada *in vitro* recentemente removida de tecidos animais. É capaz de um número limitado de divisões.

Célula semipermissiva: célula que apresenta condições intracelulares parciais para a replicação viral ou que apresenta condições para a ocorrência somente de algumas etapas do ciclo replicativo.

Célula susceptível: célula que apresenta as condições para a ocorrência completa do ciclo replicativo, desde a penetração até o egresso da progênie viral.

Cepa ou estirpe: vírus de uma determinada espécie viral que já foi caracterizado fenotipicamente e/ou genotipicamente.

Cepa de referência: cepa viral bem caracterizada que é utilizada como referência por vários laboratórios com diversas finalidades.

CD4: molécula de superfície celular que atua conjuntamente com o TCR na ligação ao MHC-II e peptídeos na superfície de APCs, no processo de reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T auxiliares. É o principal marcador molecular desta população de linfócitos.

CD8: molécula de superfície celular que atua conjuntamente com o TCR na ligação ao MHC-I e peptídeos na superfície de células infectadas por vírus e células dendríticas, no processo de reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T citotóxicos. É o principal marcador molecular desta população de linfócitos.

Chaperone: proteína ou estrutura protéica que assiste e auxilia as proteínas a assumirem a conformação tridimensional logo após a sua síntese.

Ciclinas: família de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular.

Ciclo lítico: ciclo replicativo viral que resulta na lise/destruição da célula hospedeira.

Ciclo replicativo: série de etapas que compõem a multiplicação/reprodução dos vírus em células susceptíveis.

Círculo rolante: mecanismo de replicação de DNA em que a estrutura replicativa se assemelha a um círculo em movimento. A replicação ocorre ao longo da molécula circular de DNA, resultando em uma molécula linear crescente que, posteriormente, é clivada nas unidades genômicas.

Cis-acting: sequência de nucleotídeos cuja atividade é exercida na própria molécula; geralmente serve de sítio de ligação para proteínas que ativam/reprimem a transcrição ou replicação; ex. promotores, *enhancers*, origens de replicação.

Cistron: gene.

Citocinas: substâncias solúveis secretadas por determinadas células em resposta a um estímulo e que exercem função modulatória em outras células.

Citoesqueleto: rede de fibras, fibrilas, túbulos e microtúbulos protéicos que conferem a forma e uma variedade de movimentos às células eucariotas, além de servirem de elos de ligação entre os diferentes locais e organelas no interior da célula.

Citomegalia: aumento de volume celular.

Citopatologia: patologia em nível celular. Frequentemente se manifesta sob a forma de alterações estruturais e/ou morfológicas.

Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC): mecanismo de lise celular mediada por células, que se ligam à porção Fc de imunoglobulinas que estão ligadas a antígenos na superfície da célula-alvo.

Clatrina: proteína estrutural da membrana plasmática, cuja aglomeração em certos locais antecede e media a endocitose.

Clivagem enzimática: clivagem de uma macromolécula pela ação de enzimas.

Códon: sequência de três nucleotídeos que codifica um aminoácido ou a terminação da tradução (códon de terminação).

Códon de iniciação: sequência AUG que determina o local exato do início da tradução. Este códon também codifica o aminoácido metionina.

Códon de terminação: sequência de três nucleotídeos que não codifica aminoácidos e determina a terminação da tradução (UGA, UAA, UAG).

Compactação genética: capacidade de compactar o máximo de informação genética no genoma.

Complementação: interação entre os produtos gênicos de diferentes vírus que permite a multiplicação de um ou mais vírus, sem alteração do seu genótipo.

Complemento: sistema plasmático formado por um grupo de proteínas enzimáticas inativas, cuja ativação sequencial desencadeia a formação de moléculas com atividades biológicas diversas, principalmente relacionadas com a ativação da inflamação e combate a microorganismos.

Complexo antígeno-anticorpo: complexo molecular formado pela ligação do anticorpo ao antígeno específico.

Complexo basal de transcrição: conjunto mínimo de fatores de transcrição e enzima RNA polimerase necessários para a realização de níveis basais de transcrição.

Complexo de ataque à membrana (MAC): complexo formado pelos componentes C5-C9 do complemento, que se insere e forma poros nas membranas celulares e bacterianas.

Complexo de histocompatibilidade principal (MHC): proteínas de membrana celular, envolvidas na apresentação de peptídeos endógenos (MHC-I) ou exógenos (MHC-II) para células do sistema imunológico. Identificadas inicialmente como responsáveis pela rejeição (ou não) de transplantes.

Complexo replicativo: conjunto de enzimas e fatores auxiliares que realizam a replicação do genoma.

Complexo ribonucleoproteína: complexo formado pelo RNA genômico e proteínas associadas.

Concatêmero: molécula longa de DNA formada por múltiplas cópias de unidades genômicas contínuas. Constituem-se em moléculas intermediárias na replicação do genoma de alguns vírus DNA.

Convalescença: fase de recuperação clínica.

Core (ou núcleo): estrutura compacta formada pelo genoma viral geralmente conjugado com proteínas.

Co-receptor: molécula de superfície celular que participa, juntamente com os receptores, no processo de ligação e penetração dos vírus nas células.

Corpúsculo de inclusão: estrutura intracelular produzida como resultado da replicação viral. Pode ser formado por produtos virais e/ou por estruturas celulares modificadas.

Corpúsculo de Lenz: corpúsculo de inclusão observado em neurônios do sistema nervoso central durante a infecção com o vírus da cinomose.

Corpúsculo de Negri: corpúsculo de inclusão observado em neurônios do sistema nervoso central durante a infecção pelo vírus da raiva.

Cristal violeta: corante utilizado para corar cultivos celulares.

Cromatina: complexo formado pelo DNA celular conjugado com proteínas nucleares denominadas histonas.

CTL: linfócito T que possui atividade citotóxica.

Cultivo celular: cultivo de células de animais utilizado para a multiplicação de vírus *in vitro*.

Dambos: depressões extensas no terreno que se enchem de água em épocas de chuva e secam durante a estiagem. São típicos de certas regiões da África.

Degranulação: liberação do conteúdo de grânulos citoplasmáticos.

Deleção: ausência ou remoção de um segmento do genoma.

Dendritos: prolongamentos citoplasmáticos presentes em certos tipos de células, tipicamente neurônios.

Deoxirribonucleotídeo (dNTP): nucleotídeos que contêm a desoxirribose como açúcar. São as unidades componentes do DNA.

Depopulação: remoção ou eliminação total da população de uma determinada área.

Desnaturação: perda da conformação tridimensional natural. Termo utilizado para proteínas e ácidos nucleicos.

Desnudamento: série de eventos que ocorrem após a penetração viral e que resultam na remoção parcial ou total das proteínas que recobrem o genoma, tornando-o acessível à maquinaria de transcrição e/ou tradução.

Determinante antigênico: pequena região do antígeno que se liga às regiões variáveis dos receptores de linfócitos B e T. Também denominado epitopo.

Diagnóstico sorológico: diagnóstico baseado na detecção de anticorpos específicos.

Diapedese: movimentação de células sanguíneas para fora do leito vascular e através dos tecidos.

Diluição limitante: diluição seriada utilizada para quantificar unidades víricas infecciosas presentes em um material.

Diplóide: organismo que contém duas cópias do genoma.

Disseminação hematógena: disseminação pelo sangue.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNA complementar (cDNA): molécula de DNA cuja sequência de nucleotídeos é complementar a outra molécula de DNA ou RNA.

DNA extracromossômico: molécula de DNA que não faz parte do cromossomo ou genoma celular.

DNA genômico: DNA que constitui o genoma do organismo.

DNA intermediário: molécula de DNA, complementar ao DNA genômico, que serve de intermediário na replicação do genoma de alguns vírus.

DNA polimerases: enzimas que sintetizam DNA a partir de uma molécula molde.

Doença emergente: doença que assumiu importância recentemente. Pode ser uma doença realmente nova, que aumentou de incidência ou que foi recentemente diagnosticada.

Doença esporádica: doença de ocorrência rara, imprevisível, em uma determinada população.

Doença exótica: doença que não existe em uma determinada população.

Doente: hospedeiro que apresenta sinais clínicos resultantes de alterações da fisiologia.

Doença atípica: doença cujas características clínico-patológicas diferem da maioria dos casos daquela enfermidade.

Domínio: região de uma molécula de proteína que possui uma determinada função e que assume uma conformação independente do restante da molécula. Geralmente os diferentes domínios de uma proteína são codificados por diferentes exons.

Drift antigênico: alteração antigênica discreta em proteínas de superfície de agentes infecciosos que altera o padrão de reconhecimento destes agentes pelo sistema imunológico.

Eclipse: período inicial da infecção viral em cultivo celular, no qual ocorrem as fases iniciais da replicação.

Ecosistema: conjunto de componentes físicos e biológicos presentes em uma determinada área.

Efeito citopático (ou citopatogênico): alteração morfológica de células de cultivo associada com a replicação viral. Pode ser observado sob microscopia ou, às vezes, pelo exame visual direto (placas).

Egresso: saída ou liberação da partícula vírica da célula hospedeira.

Eletroferogrupo: classificação dos rotavírus em grupos, de acordo com o padrão de migração dos segmentos genômicos em géis de poliacrilamida.

Eletroforese em gel de poliacrilamida: método de análise de ácidos nucleicos e proteínas, baseado na migração eletroforética das moléculas em uma matriz gelatinosa e porosa de poliacrilamida.

ELISA: ensaio imunoenzimático para a detecção de antígenos ou anticorpos.

Empacotamento: mecanismo de inclusão do genoma viral nas partículas víricas recém-formadas. Também chamado de *encapsidação* ou *encapsidamento*.

Encapsidação: o mesmo que empacotamento.

Endemia (enzootia): doença presente em uma determinada população e cuja incidência não apresenta grandes variações ao longo do tempo.

Endêmica: padrão de ocorrência de uma doença que ocorre naturalmente em uma população sem grandes variações de incidência ao longo do tempo.

Endocitose: mecanismo celular de internalização de partículas e macromoléculas por meio de invaginação progressiva e formação de vesículas derivadas da membrana plasmática.

Endonucleases: enzimas que clivam e degradam ácidos nucleicos, clivando as ligações entre nucleotídeos internos da molécula.

Enhancer: sequência de nucleotídeos do DNA localizada a distâncias variáveis dos locais de iniciação da transcrição. Serve de sítio de ligação para os fatores de transcrição. Não é essencial para a transcrição basal, mas aumenta a eficiência de transcrição a partir de um determinado promotor.

Enhancer constitutivo: *enhancer* cuja atividade é permanente, geralmente em níveis basais.

Ensaio de placa: ensaio biológico realizado em tapetes celulares. Baseia-se na capacidade de certos vírus de produzirem focos de destruição celular. É utilizado para a análise fenotípica, quantificação e clonagem biológica (purificação) de vírus.

Envelope: envoltório lipoprotéico externo presente em algumas famílias de vírus. É derivado de membranas celulares e contém proteínas virais inseridas.

Epidemia: aumento significativo do número de casos de uma doença em uma determinada população em um período de tempo.

Epidemia de propagação: epidemia em que o número de novos casos aumenta gradativamente ao longo do tempo.

Epidemia em ponto: epidemia caracterizada pela ocorrência de um grande número de casos em um curto intervalo de tempo.

Epissomal: livre, não integrado ao cromossomo celular.

Epitopo: o mesmo que determinante antigênico.

Epizootia: o mesmo que epidemia, termo aplicado a populações animais.

Espécie heteróloga: outra espécie, que não a espécie em questão.

Espécie homóloga: mesma espécie em questão.

Especificidade (anticorpos): propriedade de anticorpos em se ligar apenas aos epitopos que são exatamente complementares às suas regiões variáveis.

Especificidade (testes): propriedade de uma técnica diagnóstica de identificar, detectar e diagnosticar um determinado agente (ou anticorpos) e distingui-lo de outros agentes.

Espectro de hospedeiros: gama ou conjunto de hospedeiros que um agente pode potencialmente infectar.

Espectrofotômetro: aparelho que mede a capacidade de diferentes substâncias de absorver luz em diferentes comprimentos de onda. É utilizado para determinar a concentração de diversas substâncias em diferentes materiais.

Espícula (spike): projeção formada pelas proteínas de superfície de alguns vírions. O mesmo que peplômero.

Estabilidade genética: estabilidade (conservação) da sequência de nucleotídeos de um determinado genoma ao longo do tempo.

Estacional: padrão de ocorrência de doença cuja incidência apresenta variações a intervalos anuais, geralmente coincidentes com uma determinada estação do ano.

Estrutura secundária (ou terciária): conformação bi ou tridimensional adotada por macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos).

Eucariota: organismo cujo genoma é separado do citoplasma por uma membrana nuclear e dividido em cromossomos individuais.

Evasão imunológica: denominação genérica ao conjunto de mecanismos utilizados por agentes infecciosos para se evadirem da resposta imunológica montada pelo hospedeiro.

Exocitose: processo celular de secreção de macromoléculas, no qual vesículas contendo essas moléculas se fusionam com a membrana plasmática, liberando o conteúdo no meio extracelular.

Exon: sequência codificante dos genes descontínuos de eucariotas, que são unidas entre si após a remoção das sequências intervenientes (íntrons), pelo mecanismo de *splicing*.

Exonucleases: enzimas que degradam moléculas de ácidos nucleicos a partir da remoção de nucleotídeos de suas extremidades.

Expansão clonal: multiplicação de células a partir de células progenitoras individuais.

Expressão gênica: termo genérico que denota a expressão ou materialização das informações genéticas contidas no genoma. Resumidamente, refere-se à produção de proteínas e às funções decorrentes das suas atividades.

Fábrica viral: local específico no citoplasma ou núcleo onde se acumulam os produtos virais e vírions em diferentes estágios de morfogênese. É o local de replicação do genoma e produção das partículas víricas.

Fagocitose: processo celular de internalização de partículas grandes, que envolve alterações marcantes na estrutura da membrana plasmática, gasto de energia e reorganização do citoesqueleto cortical.

Fagossomo: vesícula derivada da fagocitose que contém o material fagocitado.

Fator de necrose tumoral: um tipo de interleucina secretada por leucócitos.

Fatores de transcrição: proteínas celulares que auxiliam a enzima RNA polimerase no reconhecimento, ligação aos promotores e início da transcrição.

Fenótipo: conjunto de características observáveis de um indivíduo. É o resultado da expressão do genótipo.

Fidelidade: propriedade das polimerases de DNA e RNA em produzirem cópias exatamente complementares às moléculas utilizadas como molde.

Filamentos de actina: filamentos da proteína actina que compõem o citoesqueleto.

Fita complementar (ou cadeia complementar): molécula de ácido nucleico (RNA ou DNA) cuja sequência de nucleotídeos é exatamente complementar à molécula parental que serviu de molde para a sua produção.

Fixação do complemento: técnica de detecção de anticorpos que se baseia na capacidade de moléculas de imunoglobulinas se ligarem a moléculas do complemento quando interagem com o antígeno.

Flebotomídeo: espécie de inseto hematófago. Envolvido na transmissão mecânica de alguns vírus.

Fluoresceína: substância que emite luminosidade fluorescente ao ser exposta a luz ultravioleta.

Fluxo axoplásmico: fluxo de vesículas e macromoléculas ao longo do citoplasma (axoplasma) dos axônios de neurônios.

Fômite (ou veículo): qualquer objeto (ser inanimado) que serve para transmitir um agente infeccioso entre hospedeiros.

Fonte de infecção: animal vertebrado que abriga e multiplica um vírus, podendo transmiti-lo a outro hospedeiro.

Fosfatase alcalina: enzima utilizada em testes imunoenzimáticos.

Fragmentos de Okazaki: segmentos de DNA (100: 2.000 nucleotídeos) produzidos durante a síntese da cadeia descontínua (*lagging*) na replicação semidescontínua do DNA celular e de alguns vírus.

Frameshift: mudança de fase de leitura do RNA mensageiro pelos ribossomos durante a tradução.

Fusão: processo de fusionamento entre membranas biológicas pela interação entre seus componentes. A fusão entre o envelope viral e a membrana celular proporciona a penetração do nucleocapsídeo no citoplasma da célula.

Gene: sequência de nucleotídeos nos ácidos nucleicos que codifica um produto (proteína).

Genes alfa (ou de transcrição imediata): grupo de genes dos herpesvírus que são transcritos imediatamente após a penetração viral na célula.

Genes beta (ou iniciais): grupo de genes de alguns vírus que são preferencialmente transcritos em fases iniciais do ciclo, antes da replicação do genoma.

Genes de virulência: genes cujos produtos estão envolvidos na determinação da virulência de um agente infeccioso.

Gene essencial: gene cujo produto é essencial para a replicação viral em cultivo.

Genes gama (ou tardios): grupo de genes dos herpesvírus que são transcritos somente após o início da replicação do genoma.

Gene não-essencial: gene cujo produto é dispensável para a replicação viral em cultivo celular.

Genes tardios: genes que são expressos em fases tardias do ciclo, geralmente após a replicação do genoma.

Genética reversa: denominação genérica para a metodologia utilizada para estudar a genética de organismos na ordem inversa à genética tradicional, ou seja, parte de um determinado genótipo e estuda as consequências da produção deliberada de mutações e outras alterações genéticas no fenótipo do organismo.

Genoma: molécula de ácido nucleico (DNA, RNA) que contém o conjunto completo de informações genéticas do organismo.

Genótipo: conjunto de sequências específicas e informações genéticas contidas no genoma de um organismo.

Glicoproteína: proteína que possui molécula(s) de açúcar associada(s) covalentemente.

Golden standard: teste padrão universal de um determinado método, cujos resultados servem de comparação com os resultados de outros testes.

Granzimas: enzimas contidas em grânulos citoplasmáticos de determinadas células efectoras.

Hairpin: estrutura semelhante a um grampo de cabelo, formada pelo flexionamento de moléculas de ácido nucléico sobre si mesmas. Geralmente ocorre próximo às extremidades das moléculas.

Haplóide: organismo que contém apenas uma cópia do genoma.

Helicases: enzimas que separam cadeias de DNA e RNA. São necessárias para a transcrição e replicação.

Hemadsorção: atividade biológica de proteínas de alguns vírus quando expressas na superfície de células infectadas. Refere-se à adsorção de eritrócitos à superfície celular que contém essas proteínas.

Hemaglutinação: atividade biológica de aglutinação de eritrócitos animais por partículas víricas ou por proteínas de alguns vírus.

Hemaglutinina: proteína viral responsável pela aglutinação de eritrócitos.

Hepatotrópico: agente que apresenta tropismo por células hepáticas.

Heterodímero: estrutura molecular formada pela associação de duas subunidades (moléculas) diferentes.

Hibridização: associação entre duas moléculas complementares de ácido nucléico, porém de origens diferentes.

Hibridização *in situ*: técnica de detecção de ácidos nucléicos em cortes de tecidos que utiliza o princípio da hibridização.

Híbrido: molécula de ácido nucléico de cadeia dupla cujas cadeias componentes possuem origens diferentes. Termo também utilizado para designar o organismo cujo genoma contém informações genéticas de duas espécies heterólogas.

Histonas: proteínas nucleares que se conjugam com o DNA cromossômico, proporcionando o seu empacotamento e compactação.

Homólogo: da mesma espécie, semelhante.

Homologia de nucleotídeos: grau de similaridade da sequência de nucleotídeos entre duas ou mais moléculas de ácidos nucléicos.

Horseradish peroxidase (HRPO): enzima utilizada em testes imunoenzimáticos.

Hospedeiro: espécie animal que abriga e permite a multiplicação de um determinado agente biológico.

Hospedeiro natural (ou reservatório): espécie animal na qual um determinado agente é mantido na natureza.

Hospedeiro terminal (acidental): espécie animal que pode ser, ocasionalmente, infectada por um determinado agente, mas que

não o transmite, ou seja, não participa do ciclo de manutenção do agente na natureza.

Host range *in vitro*: conjunto de tipos de células de cultivo susceptíveis à infecção por um determinado vírus.

Host-range *in vivo*: conjunto de espécies animais susceptíveis a um determinado agente. Pode-se referir a um *host range* natural (infecções naturais) ou experimental (espécies susceptíveis à infecção experimental).

Iatrogênico: transmissão de um agente entre hospedeiros, decorrente da realização de procedimentos médicos.

Icosaedro: estrutura geométrica que consiste de 20 faces triangulares arrançadas ao redor da superfície de uma esfera. Constitui-se na simetria fundamental de vários vírus.

Icossomos: estruturas esferóides encontradas associadas aos prolongamentos citoplasmáticos das células dendríticas e que contém antígenos a serem apresentados aos linfócitos.

Imortalização: denominação dada à capacidade de algumas células de cultivo de se multiplicarem indefinidamente.

Importinas: proteínas componentes do processo de importação de proteínas e outras moléculas para o interior do núcleo celular.

Imunidade: estado de resistência adquirida de um hospedeiro a um agente infeccioso.

Imunidade de mucosas: conjunto de mecanismos imunológicos localizados nas mucosas corporais.

Imunidade de população (ou de rebanho): nível e abrangência da imunidade contra um determinado agente existente em uma determinada população.

Imunidade passiva: imunidade recebida passivamente através da placenta, pelo colostro/leite, ou pela administração de soro hiperimune. É essencialmente humoral (anticorpos).

Imunização: indução de imunidade.

Imunização ativa: indução de imunidade pela exposição do hospedeiro ao antígeno.

Imunização passiva: indução de imunidade pela administração de anticorpos pré-formados (via placentária, colostrálica ou soro hiperimune).

Imunoblot: técnica de detecção de antígenos (ou anticorpos) realizada em impressões do material suspeito em membranas.

Imunocitoquímica: técnica imunoenzimática de detecção de antígenos em células.

Imunocomplexo: complexo molecular formado pela conjugação de anticorpos com o antígeno específico.

Imunocromatografia: técnica de detecção de antígenos (ou anticorpos) baseada em cromatografia.

Imunodifusão em gel de ágar (IDGA): técnica de detecção de anticorpos (e antígenos) que se baseia na migração e precipitação dos complexos antígeno-anticorpos em uma matriz de ágar.

Imunoeletromicroscopia: técnica de microscopia eletrônica que utiliza anticorpos específicos para melhor localizar e marcar o antígeno alvo.

Imunofluorescência: técnica de detecção de antígenos que utiliza anticorpos conjugados com uma substância que emite luminosidade fluorescente quando excitada por luz ultravioleta.

Imunogenicidade: potencial de determinado antígeno de estimular a resposta imunológica do hospedeiro.

Imunogold: técnica de microscopia eletrônica que utiliza anticorpos marcados com micropartículas de ouro para melhor localizar o antígeno alvo no material examinado.

Imunoistoquímica: técnica imunoenzimática de detecção de antígenos em cortes de tecidos.

Imunopatologia: patologia celular ou tecidual resultante da resposta imunológica do hospedeiro.

Imunoperoxidase: técnica imunoenzimática de detecção de antígenos (ou de anticorpos) que utiliza anticorpos marcados com a enzima peroxidase.

Inativação: supressão da viabilidade atividade química ou biológica.

Incidência: frequência relativa de novos casos de uma doença em relação ao tempo.

Indene: área livre de uma determinada doença.

Infecção: penetração e multiplicação de um agente infeccioso em um organismo (ou em células de cultivo).

Infecção abortiva: infecção que não resulta em produção de progênie viral, geralmente pela interrupção do ciclo replicativo em alguma etapa.

Infecção aguda: infecção de duração limitada, algumas vezes acompanhada de altos níveis de replicação.

Infecção disseminada: infecção que atinge vários órgãos e tecidos do hospedeiro.

Infecção latente: infecção caracterizada pela permanência do genoma do agente no hospedeiro, com expressão gênica limitada ou ausente e sem produção de progênie infecciosa.

Infecção localizada: infecção limitada a determinado sítio, tecido ou órgão.

Infecção persistente ou crônica: infecção que persiste por um longo tempo.

Infecção persistente temporária: infecção cuja replicação viral persiste por longo tempo, porém eventualmente cessa.

Infecção produtiva: infecção que resulta na produção de progênie viral infecciosa.

Infecção sistêmica: infecção disseminada por vários órgãos e tecidos, geralmente disseminada pelo sangue.

Infecção subclínica persistente: infecção persistente sem manifestações clínicas perceptíveis.

Inibição da hemaglutinação (HI): técnica de detecção de anticorpos que inibem a atividade hemaglutinante de determinados vírus.

Inoquidade: ausência de atividade (biológica) deletéria ao organismo.

Insidiosa: infecção ou doença que se dissemina rapidamente entre hospedeiros susceptíveis.

Integração: inserção de um segmento de ácido nucléico na molécula de outro ácido nucléico.

Integrase: enzima que catalisa a integração de um segmento de ácido nucléico em outra molécula de ácido nucléico.

Interferência: inibição parcial ou completa da replicação viral por outro vírus.

Interferons: grupo de peptídeos solúveis sintetizados por células infectadas e por células do sistema imunológico. Possuem atividade antiviral e/ou de modulação sobre a atividade de outras células.

Interleucinas: substâncias solúveis (geralmente peptídeos) produzidas por leucócitos e que modulam a proliferação e função de outras células.

Intermediário replicativo: molécula de ácido nucléico que se constitui em um intermediário da replicação do genoma dos vírus.

Internalização: etapa seguinte à adsorção, na qual as partículas víricas (ou os nucleocapsídeos) são internalizadas na célula.

Introns: seqüências intervenientes, não-codificantes, presentes na maioria dos genes de eucariotas. São removidos dos transcritos primários pelo mecanismo de *splicing*.

In vitro: em Virologia, geralmente se refere ao sistema de multiplicação viral em cultivos celulares.

IRES (Internal Ribosomal Entry Site): estrutura secundária encontrada próxima à extremidade 5' do RNA genômico de alguns vírus e que é necessária para o reconhecimento do RNA pelos ribossomos da célula hospedeira para o início da tradução.

Isolado: vírus obtido a partir de hospedeiros infectados e que ainda não foi caracterizado. O termo *amostra* também é utilizado para designar esses vírus.

Isolamento: obtenção do agente infeccioso viável e puro.

kb: quilobase, 1.000 nucleotídeos.

kDa: unidade de massa de proteínas. Corresponde a 1.000 daltons.

Lagging (strand): cadeia descontínua de DNA sintetizada durante a replicação semidescontínua do DNA cromossômico celular e do genoma de alguns vírus.

Latência: o mesmo que infecção latente.

Leading (strand): cadeia contínua de DNA sintetizada durante a replicação semidescontínua do DNA cromossômico celular e do genoma de alguns vírus.

Lentogênica: denominação dada a amostras do vírus da doença de Newcastle (NDV) pouco patogênicas.

Letalidade: medida da mortalidade entre os animais que desenvolvem uma determinada doença.

Ligase: enzima que catalisa a ligação entre extremidades de moléculas de ácidos nucleicos. **Linfócitos B:** população de linfócitos envolvidos na resposta humoral (produção de anticorpos) e que possuem moléculas de imunoglobulinas como marcadores de membrana.

Linfócitos T auxiliares: população de linfócitos cuja função principal é secretar interleucinas que estimulam e modulam a resposta imunológica celular e humoral. Possuem moléculas de TCR e CD4 como marcadores de membrana.

Linfócitos T citotóxicos: população de linfócitos cuja função principal é identificar e destruir células infectadas por vírus. Também secretam algumas interleucinas. Possuem o TCR e CD8 como marcadores de membrana.

Linhagem celular: população de células homogêneas derivadas de células removidas de animais e cultivadas *in vitro*.

Linhagem contínua: linhagem de células homogêneas e bem caracterizadas, geralmente capazes de multiplicação infinita *in vitro*.

Lise celular: morte e desintegração da célula causada pela ruptura da membrana plasmática.

Lisossomo: vesícula intracelular que contém enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação ou digestão de material internalizado por endocitose ou fagocitose.

Luminômetro: aparelho que quantifica a emissão de luminosidade.

Macrófago: célula derivada dos monócitos sangüíneos cujas funções principais são a fagocitose, digestão e reorganização tecidual, secreção de citocinas, processamento e apresentação de antígenos a linfócitos T auxiliares.

Macropinocitose: pinocitose de macromoléculas ou de partículas grandes.

Matriz: camada protéica, geralmente composta por múltiplas moléculas de uma única proteína, localizada entre o nucleocapsídeo e o envelope de alguns vírus.

Maturação: etapa final do ciclo replicativo, na qual as partículas recém-formadas adquirem infectividade. Em alguns vírus, ocorre concomitantemente com a morfogênese.

Membrana plasmática: membrana celular que delimita o compartimento citoplasmático e o separa do meio extracelular. Também denominada membrana celular.

Memória imunológica: propriedade que permite ao sistema imunológico reagir de forma e magnitude diferentes em exposições subseqüentes ao um mesmo antígeno.

Mesogênica: denominação dada a amostras do NDV medianamente patogênicas.

Minicromossomo: estrutura semelhante aos cromossomos celulares, formada pela associação do genoma dos poliovírus e papilomavírus com proteínas celulares chamadas de histonas.

Mistura fenotípica: mescla de componentes fenotípicos, sem a ocorrência de interações genéticas.

Molde (ou modelo): molécula de ácido nucléico utilizada como modelo para a síntese de uma molécula exatamente complementar.

Monocamada (monocapa, tapete): camada única e plana de células, geralmente achatadas, que se multiplicam aderidas à superfície de frascos de cultivo.

Monocistônico: segmento de DNA ou RNA que contém apenas uma região codificante (cistron = gene).

Monócito: célula sangüínea da linhagem mielóide que origina os macrófagos.

Monômero: unidade básica que compõe as macromoléculas.

Morfogênese: mecanismo de montagem das partículas víricas a partir dos componentes pré-formados. Também denominada reunião.

Motif (motivo) de DNA/RNA: seqüências específicas de nucleotídeos localizadas próximas aos locais de iniciação da transcrição dos genes. Servem de sítios de reconhecimento e ligação para os fatores de transcrição e RNA polimerase para o início da transcrição.

Motif (motivo) de proteína: seqüência específica de aminoácidos ou estrutura tridimensional específica correlacionada com alguma atividade ou função.

mRNA: RNA mensageiro, molécula de RNA intermediária na síntese protéica.

mRNA policistônico: RNA mensageiro que contém mais de uma região codificante.

mRNA subgenômico: RNA mensageiro com extensão menor do que o genoma.

miRNA: RNA pequenos produzidos durante a infecção com alguns vírus e que interferem com funções celulares e virais.

Multiplicidade de infecção (moi): número aproximado de partículas víricas infecciosas por célula contida em uma suspensão viral inoculada em cultivo celular.

Mutação: alteração da sequência de nucleotídeos de uma molécula de ácido nucléico em comparação com a molécula parental.

Mutação em ponto: substituição de um nucleotídeo na molécula de ácido nucléico, comparando-se com a molécula parental.

Mutação espontânea: mutação que ocorre naturalmente, decorrente de erros da polimerase ou por fatores externos.

Mutação induzida: mutação induzida propositalmente pelo uso de agentes químicos ou físicos.

Mutação letal: mutação que resulta na inviabilidade absoluta do organismo que a possui.

Mutação missense: mutação pontual que resulta na codificação de um aminoácido diferente do original.

Mutação nonsense: mutação pontual que resulta na criação de um códon de terminação da tradução.

Mutação silenciosa: mutação pontual que não resulta na alteração do aminoácido codificado.

Mutagênese direcionada: mutação introduzida artificialmente, na qual se substitui os nucleotídeos desejados.

Mutante: organismo que possui uma ou mais mutações no genoma.

Mutante atenuado: vírus mutante que possui patogenicidade e virulência reduzidos em comparação com o organismo parental.

Mutante condicional: vírus cujo fenótipo mutante se manifesta apenas em algumas condições.

Mutante de escape: vírus que possui mutação – ou mutações – que resulta na falha de reconhecimento de suas proteínas de superfície por anticorpos neutralizantes do hospedeiro.

Mutante de gama de hospedeiro: vírus mutante que possui a capacidade de infectar um conjunto de espécies hospedeiras diferente do vírus parental.

Mutante de placa pequena: vírus mutante cuja replicação em cultivos celulares resulta em focos menores de destruição celular, comparando-se com o vírus parental.

Não-citopático: vírus cuja replicação em cultivo celular não resulta em citopatologia aparente.

nested PCR: variação da técnica de PCR em que um segmento interno do produto da primeira reação é reamplificado em uma segunda reação.

Neuraminidase: glicoproteína do envelope de alguns vírus que cliva a ligação dos vírions ao ácido siálico.

Neuroinvasividade: propriedade de invadir o sistema nervoso central a partir de penetração e replicação inicial em sítios periféricos.

Neurovirulência: propriedade de replicar no sistema nervoso central e causar doença neurológica.

Neutralização: supressão da capacidade infectiva.

Nível de erro limitante: frequência de mutação limite para a viabilidade do organismo.

Northern blot: técnica de detecção de RNA que se baseia no princípio da hibridização e utiliza oligonucleotídeos complementares a sequências da molécula alvo como sonda.

Nt: nucleotídeo de uma molécula de ácido nucléico.

Núcleo celular: compartimento de células eucariotas que contém o genoma e é delimitado e separado do citoplasma por uma membrana.

Nucleocapsídeo: estrutura formada pelo genoma viral associado com proteínas e revestida externamente pelo capsídeo.

Nucleoproteínas: proteínas que se conjugam com o genoma viral, formando o *core* (ou núcleo).

Nucleossomo: unidade estrutural da cromatina celular, formada pelo DNA enrolado ao redor de uma massa cilíndrica formada pelas histonas.

Núcleo viral (*core*): estrutura compacta formada pelo genoma associado com proteínas.

Oligonucleotídeo: molécula linear formada por um número limitado de nucleotídeos ligados entre si.

Oligossacarídeo: polímeros pequenos de açúcar.

Oncogene: gene que codifica uma proteína capaz de induzir transformação tumoral em células.

Oncogênese: indução ou produção de neoplasias.

Oncogênese insercional: indução de neoplasias pela inserção do genoma viral em cromossomos celulares, alterando a expressão de genes envolvidos na indução ou repressão da formação de tumores.

Opsonização: revestimento de partículas por determinadas substâncias (complemento, anticorpos) e que facilita a fagocitose.

ORF (sequência aberta de leitura): sequência de nucleotídeos de um gene ou mRNA que é traduzida em proteína; inicia-se em

um códon iniciador (AUG) e termina em um códon terminador (UAA, UAG ou UGA).

Órgãos linfóides secundários: órgãos linfóides que servem de locais de maturação e proliferação de células linfóides em resposta a antígenos.

Origem da replicação (ori): sequência específica do DNA (ou RNA) genômico que serve de sítio de reconhecimento, ligação e início da replicação pelo complexo enzimático envolvido na replicação do respectivo genoma.

Ovo embrionado: ovo de galinha com embrião em desenvolvimento.

Ovoscópio: aparelho utilizado para se examinar ovos embrionados em desenvolvimento.

Palíndromo: sequência de nucleotídeos cuja ordem dos nucleotídeos individuais é a mesma em ambas as direções.

Pandemia: epidemia de proporções continentais ou mundiais.

Panhandle: estrutura semelhante a um cabo de panela, formada pelo pareamento de sequências complementares localizadas nas extremidades de moléculas de DNA e/ou RNA.

Paraendêmica: doença de ocorrência rara, esporádica.

Partícula Dane: partícula vírica completa, infecciosa, do vírus da hepatite B.

Partícula defectiva: partícula vírica anômala, não-infecciosa, produzida no ciclo replicativo de alguns vírus. Essas partículas geralmente contêm genomas defectivos em um ou mais genes e, por isso, são capazes de replicar autonomamente.

Partícula infecciosa: partícula vírica infectiva, viável, capaz de infectar e replicar autonomamente uma célula suscetível.

Partícula viral: o mesmo que partícula vírica, vírion.

Partícula vírica: o mesmo que partícula viral, vírion.

Passagem (de células): refere-se a cada subcultivo das células cultivadas *in vitro*. Os termos repique e subcultivo também são utilizados.

Passagem (de vírus): refere-se a uma etapa de multiplicação do vírus em células de cultivo. Inicia com a inoculação e termina com a coleta do sobrenadante contendo a progênie viral. Dependendo do vírus e do intervalo entre a inoculação e a coleta, cada passagem pode abranger mais de um ciclo replicativo do vírus.

Patogenicidade: capacidade do agente de produzir doença nos hospedeiros.

Pb: par de bases. Refere-se a unidades formadas pelo pareamento entre duas bases complementares em moléculas de ácido nucleico (DNA, RNA) de fita dupla.

PCR: técnica de amplificação enzimática de sequências específicas de ácidos nucleicos pelo uso de enzimas polimerases.

PCR em tempo real: variação da técnica de PCR em que os resultados podem ser obtidos à medida que o processo de amplificação ocorre e não apenas ao final, como na técnica tradicional.

PCR *in situ*: variação da técnica de PCR utilizada para a detecção e amplificação de ácidos nucleicos diretamente em cortes de tecidos.

Penetração: etapa do ciclo replicativo dos vírus em que o nucleocapsídeo ou o genoma ultrapassam a membrana plasmática e ganham acesso ao citoplasma celular. Pode ocorrer na superfície celular ou em vesículas endocíticas ou fagocíticas.

Peplômero: projeção protéica presente na superfície de alguns vírions, formada por glicoproteínas virais.

Peptídeo: molécula linear composta por um número limitado de aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas.

Perfil eletroforético: perfil de migração de segmentos de ácidos nucleicos ou proteínas em eletroforese.

Perforinas: proteínas presentes em células NK e linfócitos T citotóxicos que, quando secretadas, produzem poros na membrana plasmática das células-alvo.

Período de incubação: intervalo de tempo entre a infecção de um hospedeiro e o início dos sinais clínicos.

Período de incubação extrínseco: período de replicação do vírus no artrópode vetor antes de poder ser transmitido pelo vetor.

Período de transmissibilidade (ou comunicabilidade): período de excreção do agente pelo hospedeiro infectado.

Período pré-patente: período entre a infecção e o início da excreção do agente pelo hospedeiro recém-infectado.

Período prodrômico: período situado no final do período de incubação, quando o hospedeiro apresenta sinais inespecíficos de doença.

Permissividade: propriedade das células em permitir a ocorrência das etapas intracelulares da replicação viral.

Placa: foco localizado de alterações morfológicas ou destruição celular produzido pela replicação viral em monocamadas de células.

Placas de Peyer: acúmulos linfóides localizados na submucosa do intestino delgado de mamíferos.

Plasmídeos: moléculas extracromossômicas de DNA, geralmente circulares, encontradas em procariotas. Replicam independentemente do DNA cromossômico.

Plasmócitos: células derivadas da proliferação e diferenciação dos linfócitos B, especializadas na secreção de imunoglobulinas.

Polaridade negativa (sentido negativo): sequência de nucleotídeos que é complementar a sequência do RNA mensageiro (que, por convenção, possui polaridade positiva).

Polaridade positiva: sequência de nucleotídeos com o mesmo sentido do RNA mensageiro.

Poliadenilação: adição de uma sequência de adeninas (100-200) à extremidade 3' do RNA mensageiro.

Policistrônico: segmento de DNA ou RNA que contém mais de uma região codificante (cistron = gene).

Polimerases: enzimas que sintetizam ácidos nucleicos (RNA, DNA) a partir de um molde.

Polimerização: adição sequencial de nucleotídeos durante a síntese de moléculas de DNA e RNA.

Poliploidia: presença de várias cópias do genoma em um organismo.

Poliproteína: proteína extensa que é clivada à medida que vai sendo produzida, originando proteínas menores com funções diversas.

Poliribossomos: agregados citoplasmáticos de vários ribossomos, nos quais ocorre a tradução de RNAs mensageiros.

Pontos quentes (*hot spots*): locais do DNA ou RNA que apresentam uma frequência maior de mutações do que o restante do genoma.

População: grupo de indivíduos no qual se está estudando algum aspecto relacionado à saúde ou doença.

População de risco: parcela da população que é susceptível a um determinado agente ou doença.

População local: população restrita geograficamente, cujos indivíduos componentes interagem entre si com certa frequência.

Portador: hospedeiro que abriga o agente e permite a sua multiplicação sem manifestar sinais clínicos da infecção.

Portador ativo: portador que abriga e excreta o agente.

Portador passivo: portador que abriga, mas não excreta o agente.

Prevalência: frequência relativa de um fator relacionado à saúde ou à doença em um determinado momento em uma população.

Primases: enzimas capazes de iniciar a síntese de DNA a partir de um molde, propriedade inerente a algumas DNA polimerases.

Primer: oligonucleotídeo (RNA ou DNA) que serve de iniciador para a síntese de DNA.

Primovacinação: primeira administração de um determinado antígeno a um hospedeiro.

Procariota: organismo cujo material genético não se encontra separado do restante da célula por uma membrana.

Produto de PCR (amplicon): segmento de DNA ou RNA amplificado por PCR.

Progênie viral: população de vírions resultantes da replicação viral.

Promotor: sequência de nucleotídeos do DNA localizada próxima ao local de iniciação da transcrição. Serve de sítio de ligação para os fatores de transcrição e/ou RNA polimerase.

Proofreading: sistema de correção de erros durante a polimerização (síntese) de ácidos nucleicos, no qual as polimerases removem nucleotídeos errados, eventualmente incorporados, e os substituem pelos nucleotídeos corretos.

Protease: enzima que cliva e/ou degrada proteínas.

Protease de cisteína: protease que cliva proteínas em locais onde existem aminoácidos do tipo cisteína.

Proteção cruzada: proteção contra agentes heterólogos, porém semelhantes, produzida pela imunização com um determinado agente.

Proteína de matriz: proteína estrutural que reveste internamente o envelope de alguns vírus, mediando as suas interações com o nucleocapsídeo.

Proteína de fusão: proteína da superfície dos vírions responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular e a conseqüente penetração do material genético na célula hospedeira.

Proteína endógena: proteína produzida no interior da célula.

Proteína estrutural: proteína viral que faz parte da estrutura da partícula vírica.

Proteína exógena: proteína de origem externa à célula ou hospedeiro.

Proteína heteróloga: proteína estranha, de organismo diferente.

Proteína imunodominante: proteína com capacidade superior de estimular o sistema imunológico.

Proteína integral de membrana: proteína que se encontra inserida em membranas celulares por meio de uma região transmembrana.

Proteína motora: proteína que participa dos sistemas de transporte de macromoléculas no interior das células.

Proteína não-estrutural: proteína viral que não faz parte da estrutura da partícula vírica.

Proteína periférica de membrana: proteína que se encontra associada com membranas, sem, no entanto, possuir uma região transmembrana.

Proteína terminal (TP): proteína ligada covalentemente à extremidade 5' do genoma dos adenovírus.

Proteína truncada: proteína incompleta produzida pela terminação precoce da tradução devido à presença de um códon de terminação na região codificante.

Protômero: unidade estrutural dos capsídeos, forma os capsômeros.

Prova biológica: teste diagnóstico da raiva, em que camundongos lactentes são inoculados pela via intracerebral com um macerado de cérebro de animais suspeitos de terem contraído a enfermidade.

Provírus: molécula de DNA de fita dupla, em que uma das cadeias é exatamente complementar ao RNA genômico dos retrovírus.

Pseudovírião: partícula vírica incompleta, não-infecciosa, dos poliomavírus e de outros vírus.

Quarentena: período de isolamento e observação clínica de hospedeiros, para verificar se se encontram no período de incubação de uma doença infecciosa.

Quasispecies: população heterogênea de variantes virais que compõem uma população de vírus. São típicas de vírus RNA.

Quilobase (kb): unidade de ácido nucléico que equivale a 1.000 bases.

Quimiotaxia: movimentação de células inflamatórias através dos tecidos em resposta a estímulos químicos.

Quinase: enzima que fosforila determinados substratos.

Quinesina: proteína componente de um dos sistemas intracelulares de transporte de macromoléculas.

Radioimunoensaio: técnica de detecção de antígenos e anticorpos que utiliza anticorpos específicos conjugados com isótopos radioativos.

Reação sorológica cruzada: reação imunológica do soro que contém anticorpos contra um determinado agente, com antígenos de outro agente antigenicamente semelhante.

Rearranjo: denominação genérica para alterações na sequência e estrutura de moléculas de ácidos nucléicos. Essa definição abrange inserções, duplicações, deleções e outras alterações genéticas.

Reativação: retomada da replicação produtiva após um período de infecção latente.

Reatividade cruzada: o mesmo que reação sorológica cruzada.

Receptor viral: molécula da superfície celular que serve de sítio de ligação para os vírions.

Recombinação: intercâmbio de seqüências genômicas entre dois ou mais genomas.

Recombinação homóloga: recombinação entre moléculas de DNA com seqüências semelhantes.

Recombinação intramolecular: intercâmbio de seqüências genômicas entre locais diferentes de uma mesma molécula de ácido nucléico.

Recombinante: organismo que contém no seu genoma material genético heterólogo, produto de recombinação.

Recrudescência: ressurgimento de manifestações clínico-patológicas de doença.

Refratariedade: estado de resistência absoluta de uma espécie animal a um agente infeccioso.

Região conservada: seqüência de nucleotídeos (ou de aminoácidos) que é pouco variável entre os vírus pertencentes a uma mesma espécie viral (ou entre diferentes vírus).

Região regulatória: região do genoma que contém promotores e *enhancers* e que, por isso, está envolvida na regulação da transcrição e expressão gênica.

Região intergênica (IR): seqüência de nucleotídeos não-codificante situada entre regiões codificantes de genomas.

Renaturação: retorno à conformação e estrutura nativa original por moléculas de ácidos nucléicos e proteínas previamente submetidas à desnaturação.

Replicação (de ácido nucléico): síntese ou duplicação de uma molécula de ácido nucléico a partir de uma molécula parental.

Replicação abortiva: replicação viral interrompida em alguma etapa do ciclo e que não resulta na produção de progênie infecciosa.

Replicação primária: replicação viral que ocorre no início da infecção de um hospedeiro, geralmente em sítios próximos ao local de penetração.

Replicação semidescontínua: mecanismo de replicação do DNA em que a síntese de uma das moléculas é realizada de forma contínua e a outra de forma descontínua.

Replicação viral: denominação genérica para o processo de multiplicação dos vírus.

Replicase: enzima (polimerase de RNA) envolvida na replicação do genoma de vírus RNA.

Replicativo intermediário: molécula de DNA ou RNA que se constitui em um intermediário no processo de replicação do genoma.

Replicon: molécula de ácido nucléico que contém as informações para a sua própria replicação.

Reprodutibilidade: propriedade de uma técnica diagnóstica em produzir resultados reproduzíveis ou idênticos quando repetida.

Reservatório: o mesmo que hospedeiro natural.

Resolvases: enzimas envolvidas na fase final da replicação do genoma de alguns vírus, em que as moléculas-filhas são individualizadas pela clivagem de multímeros ou de moléculas complexadas.

Resposta celular: resposta imunológica mediada por células efectoras.

Resposta humoral: resposta imunológica mediada por imunoglobulinas.

Resposta imune: conjunto de mecanismos efetores desencadeados em resposta à estimulação antigênica.

Resposta imune adquirida: resposta imune montada ativamente pelo hospedeiro em resposta à exposição ao antígeno.

Resposta imune inata: conjunto de mecanismos inespecíficos que compõem a defesa do organismo contra agentes patogênicos.

Resposta imunológica: conjunto de mecanismos moleculares e celulares produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro em resposta a exposição a um determinado agente.

Resposta primária: resposta imunológica montada pelo hospedeiro em uma primeira exposição a um determinado antígeno.

Resposta secundária: resposta imunológica montada pelo hospedeiro em reexposições a um determinado antígeno.

Ressortimento: evento de recombinação genética caracterizada pela troca de segmentos genômicos entre dois ou mais vírus durante uma co-infecção. Ocorre somente em vírus que possuem o genoma segmentado.

Retículo endoplasmático: compartimento intracitoplasmático, local de síntese de certas proteínas e em cujo lúmen essas proteínas sofrem modificações.

Retrógrado: relativo à direção do transporte neuronal (das extremidades dos axônios ou dendritos para o corpo neuronal).

Reversão à virulência: reaquisição do fenótipo virulento por um mutante viral atenuado.

Ribavirina: droga que possui atividade antiviral contra alguns vírus RNA.

Ribonuclease: enzima que cliva e degrada moléculas de RNA.

Ribonucleoproteína: complexo formado por RNA genômico e proteínas virais associadas.

Ribonucleotídeo redutase: enzima envolvida do metabolismo de nucleotídeos para a síntese de DNA.

RNA: ácido ribonucléico.

RNA antígenômico: RNA com sentido contrário (complementar) ao RNA genômico. Também chamado de RNA complementar ou intermediário replicativo.

RNA complementar: molécula de RNA com sequência complementar ao genoma (também denominado RNA antígenômico).

RNA de polaridade negativa: RNA cuja sequência não permite a sua tradução direta pelos ribossomos (não contém as sequências

codificantes de aminoácidos). Também denominado RNA de sentido negativo, RNA de cadeia negativa ou simplesmente RNA negativo. Possui sequência complementar ao RNA mensageiro.

RNA de polaridade positiva: RNA que é traduzido diretamente pelos ribossomos; possui sentido de RNA mensageiro (contém as sequências codificantes de aminoácidos). Também denominado RNA de sentido positivo, RNA de cadeia positiva ou simplesmente RNA positivo.

RNA genômico: ácido nucléico que constitui o genoma viral. Esse termo é utilizado para diferenciá-lo de outros RNAs virais produzidos durante o ciclo replicativo e que não são incluídos nos vírions.

RNA intermediário: molécula de RNA que serve de intermediário na replicação do genoma. Possui polaridade inversa à do genoma.

RNA mensageiro (mRNA): RNA intermediário da síntese protéica. Produto da transcrição e de modificações co e pós-transcripcionais (adição do *cap*, cauda poliA, *splicing*). RNA apto a ser traduzido em proteína

RNA monocistrônico: molécula de mRNA que possui apenas uma sequência codificante (ORF). Contém apenas um gene.

RNA polimerases: enzimas que sintetizam RNAs a partir de um molde DNA ou RNA.

RNA pol II: RNA polimerase celular que realiza a transcrição dos genes que codificam proteínas.

Sazonal ou estacional: padrão de ocorrência de uma doença, em que variações de incidência ocorrem a intervalos anuais, coincidentes com as estações do ano.

SDS-PAGE: técnica de análise de proteínas e de ácidos nucléicos (de baixo peso molecular), que se baseia na separação eletroforética das moléculas em um gel de poliácridamida.

Sensibilidade: capacidade da técnica em detectar mínimas quantidades do respectivo alvo (proteína, ácido nucléico, vírus etc.).

Sentido negativo: o mesmo que polaridade negativa (RNA).

Sentido positivo: o mesmo que polaridade positiva (RNA).

Seqüência-alvo: determinada região de uma molécula de DNA ou RNA a ser amplificada por PCR. É a seqüência compreendida entre os dois *primers*.

Seqüência cis-acting: ver cis-acting.

Seqüência consenso: seqüência de nucleotídeos predominante (ou mais freqüente) em vários isolados, amostras ou cepas de um mesmo vírus ou em clones de um mesmo vírus.

Seqüência conservada: o mesmo que região conservada.

Seqüência regulatória: denominação genérica para uma seqüência de nucleotídeos que serve para a ligação de fatores

de transcrição e enzima polimerase para o início da transcrição. Significado semelhante, porém mais abrangente e genérico do que promotor e *enhancer*.

Seqüenciamento: determinação da seqüência de nucleotídeos de uma molécula de ácido nucléico.

Shift antigênico: alteração marcante no perfil antigênico de um vírus, que resulta na falha de reconhecimento por anticorpos produzidos contra o vírus original. Geralmente surge nos vírus da influenza, fruto de ressortimento entre dois vírus diferentes com troca nos genes que codificam as glicoproteínas HA e NA.

Sinal de localização nuclear (NLS): seqüência de aminoácidos presente em algumas proteínas que as direcionam para o núcleo da célula.

Sinal mitogênico: sinal químico (mediador) que determina o início dos processos bioquímicos celulares que culminam com a mitose celular.

Sincício: massa celular multinucleada resultante da fusão de várias células.

Sistema avidina-biotina: sistema de amplificação de sinal utilizado em testes de detecção de antígeno (e anticorpos) para aumentar a sensibilidade. Baseia-se na grande afinidade e nos vários sítios na biotina em que se ligam moléculas de avidina.

Sistema complemento: ver complemento.

Sistema heterólogo: outra espécie de organismo (bactéria, levedura, célula de inseto).

Sítios de privilégio: sítios ou locais no organismo que apresentam algum tipo de restrição ao acesso de células e moléculas envolvidas na resposta imunológica.

Sonda: oligonucleotídeo sintético ou fragmento de DNA ou RNA conjugado com um marcador radioativo ou enzimático utilizado para detectar seqüências específicas de ácidos nucléicos em testes de hibridização.

Soroconversão: produção de anticorpos contra um determinado antígeno ou agente. Termo também utilizado para designar um aumento nos níveis de anticorpos contra um determinado antígeno ou agente.

Sorogrupo: grupo de vírus que induzem em seus hospedeiros uma reatividade sorológica cruzada entre si e que pode ser distinguida sorologicamente de outros grupos.

Soro-hiperimune: soro animal que contém altos títulos de anticorpos específicos contra um determinado antígeno ou agente.

Sorologia: denominação genérica de métodos destinados a detectar anticorpos específicos contra um agente em amostras clínicas (geralmente soro).

Soro-neutralização (SN): teste de detecção de anticorpos com atividade antiviral neutralizante.

Soropositivo: indivíduo que apresenta anticorpos específicos para um determinado agente. Em algumas infecções, a soropositividade do animal indica a presença da infecção.

Soroprevalência: prevalência de um determinado agente na população determinada pela detecção de anticorpos específicos. É a freqüência relativa de animais com anticorpos contra um agente em um determinado momento em uma população.

Sorotipo: vírus ou grupo de vírus cujos membros apresentam reatividade sorológica cruzada entre si e que podem ser distinguidos sorologicamente de outros vírus ou grupos de vírus.

Southern blot: técnica de detecção de DNA que se baseia no princípio da hibridização e utiliza oligonucleotídeos complementares a seqüências da molécula-alvo como sonda.

Splicing: mecanismo de processamento dos transcritos primários (RNA) resultantes da transcrição de genes descontínuos de eucariotas, pelo qual os introns são removidos, e os exons são religados entre si.

Splicing alternativo: mecanismo pelo qual um transcrito pode originar diferentes mRNAs (e diferentes proteínas) pela remoção diferencial de introns e ligação entre diferentes exons.

Suabe: dispositivo composto por uma haste com material absorvente na extremidade utilizado para coletar secreções orgânicas para exames.

Subclínica: sem manifestações clínicas perceptíveis.

Substrato: composto químico utilizado em testes imunoenzimáticos, que sofre alterações químicas pela ação de enzimas.

Substrato cromogênico: substrato que muda de coloração pela ação de enzimas específicas.

Substrato luminescente: substrato que emite luminosidade pela ação de enzimas específicas.

Sulfato de heparina: molécula pequena conjugada com proteínas de superfície de células de uma diversidade de tecidos. Faz parte do (ou se constitui no) complexo molecular utilizado como receptor para alguns vírus.

Surto: o mesmo que epidemia.

Susceptibilidade: propriedade das células (ou do hospedeiro) em permitir a infecção natural e multiplicação dos vírus.

Tapete celular: monocamada formada por células animais sobre a superfície dos frascos de cultivo.

Taq polimerase: DNA polimerase do organismo *Thermophilus aquaticus* amplamente utilizada para amplificação de ácidos nucléicos *in vitro*.

TATA box: pequena seqüência de timidinas e adeninas localizada próxima ao sítio de iniciação da transcrição de inúmeros genes e que faz parte do promotor destes genes.

Taxa de morbidade: frequência de doença causada por um determinado agente em relação à população de risco exposta.

Taxa de mortalidade: frequência de morte causada por um determinado agente em relação à população de risco exposta.

Taxa de mutação: frequência de mutação determinada pelo número de mutações introduzidas por unidade genômica a cada ciclo de replicação.

Tegumento: substância protéica amorfa presente entre o nucleocapsídeo e o envelope dos herpesvírus.

TCR: receptor de linfócitos T.

Técnica sorológica: técnica de detecção de anticorpos.

Telomerase: enzima que replica as extremidades do DNA cromossômico celular.

Template (molde ou modelo): molécula de DNA ou RNA utilizada como molde (ou modelo) pelas polimerases para a síntese de moléculas exatamente complementares (moléculas-filhas).

Tendência secular: padrão de variação de doenças cuja incidência varia lenta e discretamente ao longo de grandes períodos.

Termociclador: aparelho utilizado para a técnica de PCR. Produz ciclos contínuos, constituídos por três etapas, com temperaturas diferentes, que proporcionam a ocorrência das três reações: desnaturação, anelamento e extensão.

Teste de Coggins: teste de imunodifusão em ágar, utilizado como teste oficial de diagnóstico da anemia infecciosa equina.

Teste sorológico: teste de detecção de anticorpos.

Timidina quinase (TK): enzima que fosforila a timidina para a sua incorporação a moléculas de DNA.

Título: medida relativa da quantidade de vírus infecciosos ou de anticorpos presentes em um determinado material.

Título viral: medida indireta do número de partículas víricas infecciosas presentes em um material.

Titulação: método de determinação do título viral.

Tolerância imunológica: ausência de resposta imunológica contra determinado antígeno.

Topoisomerase: enzima que altera o estado superenrolado do DNA, geralmente promovendo um relaxamento do tensionamento por clivagem de uma ou das duas cadeias.

Toróide: forma semelhante a um fuso, porém sem a extremidade afilada.

Tradução: decodificação do código genético pelos ribossomos, em que cada sequência de três bases (códon) é convertida em um aminoácido. Processo de síntese de proteínas a partir da sequência de nucleotídeos do mRNA.

Trans-acting: produto cuja função é exercida à distância.

Transativador: proteína celular ou viral que atua estimulando ou favorecendo a transcrição de genes.

Transcrição: síntese de moléculas de RNA de sentido positivo (mRNA) a partir de um molde RNA ou DNA.

Transcrição reversa: síntese de moléculas de DNA complementar a partir de um molde RNA.

Transcriptases: enzimas virais responsáveis pela transcrição do genoma dos vírus RNA (replicases).

Transcriptase reversa: enzima viral que sintetiza DNA a partir de um molde RNA.

Transcrito: molécula de RNA resultante da transcrição.

Transcrito associado à latência (LAT): transcrito RNA detectado no núcleo de neurônios durante a infecção latente pelos alfa herpesvírus.

Transcrito primário: produto inicial da transcrição (RNA), antes de qualquer modificação.

Transtadial: transmissão de agentes através de diferentes estágios de desenvolvimento (em organismos que as possuem em seu ciclo de vida).

Transfecção: introdução do genoma viral em células por meios artificiais para permitir a replicação.

Transformação: alteração morfológica, bioquímica ou de padrão de divisão de uma célula.

Transformação tumoral: transformação celular com características fenotípicas de células neoplásicas, tumorais.

Transgênico: organismo geneticamente modificado que contém gene(s) heterólogo(s).

Transição: substituição de uma base purínica por outra purínica; ou de uma pirimidina por outra pirimidina.

Translocação: transposição da membrana ou da separação física entre compartimentos. Penetração do genoma viral no citoplasma ou no núcleo.

Transmissão aérea: transmissão de agentes por meio de aerossóis ou de pequenas partículas transportadas pelo ar.

Transmissão direta: transmissão de agentes pelo contato entre as superfícies corporais.

Transmissão horizontal: transmissão de agentes entre indivíduos, proporcionada pela convivência e contato.

Transmissão iatrogênica: transmissão de agentes entre hospedeiros por procedimentos médicos.

Transmissão indireta: transmissão de agentes entre hospedeiros por intermédio de seres animados ou de objetos inanimados.

Transmissão perinatal: transmissão de agentes da mãe para a progênie durante ou nas proximidades do parto.

Transmissão transovariana: transmissão de agentes dos progenitores para a progênie por meio dos gametas.

Transmissão transplacentária: transmissão de agentes da fêmea para os embriões ou fetos através da placenta.

Transmissão vertical: transmissão de agentes dos progenitores para a progênie.

Transporte anterógrado: transporte de macromoléculas do corpo neuronal em direção às extremidades dos axônios ou dendritos.

Transporte axoplasmático rápido: transporte rápido de macromoléculas ao longo de axônios.

Transporte retrógrado: transporte de macromoléculas das extremidades dos axônios ou dendritos em direção ao corpo neuronal.

Transversão: mutação que resulta na substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa.

Tripsina: enzima utilizada para individualizar células de tecidos e de cultivo.

Tropismo: predileção de um vírus por determinadas células, tecidos ou órgãos.

Ubiquitina: proteína celular utilizada como marcador para proteínas destinadas à degradação.

Unidade formadora de placa: unidade de medida referente à quantidade de partículas infecciosas presentes em uma suspensão viral.

Unidade transcripcional: segmento de DNA que abrange a região transcrita por um evento de iniciação, alongação e terminação de transcrição.

UTR (NTR): região não-traduzida do genoma.

Vacina: preparação de antígenos utilizada para induzir resposta imunológica específica no hospedeiro.

Vacina atenuada: vacina que contém o agente viável, porém com patogenicidade e virulência reduzidas.

Vacina atenuada por deleção: vacina replicativa que contém o agente atenuado pela deleção de genes envolvidos com a virulência.

Vacina com marcador antigênico: vacina que induz uma resposta sorológica diferenciável da resposta induzida pela infecção natural.

Vacina de proteínas recombinantes: vacina constituída por proteínas virais produzidas em organismos recombinantes (bactérias, leveduras).

Vacina de peptídeos sintéticos: vacina constituída por peptídeos sintéticos (pequenas seqüências de aminoácidos) correspondentes aos epitopos imunodominantes do agente de interesse.

Vacina deletada: vacina que contém o agente com deleção em um ou mais genes.

Vacina diferencial: o mesmo que vacina com marcador antigênico.

Vacina de DNA: vacina composta por moléculas de DNA que contém o gene da proteína contra a qual se deseja produzir resposta imunológica.

Vacina inativada: vacina que contém o agente inativado, inviável, não-replicativo.

Vacina monovalente: vacina que contém antígenos de apenas um agente.

Vacina multivalente: vacina que contém antígenos de vários agentes.

Vacina morta: o mesmo que vacina inativada.

Vacina não-replicativa: vacina que não contém o agente replicativo.

Vacina polivalente: o mesmo que vacina multivalente.

Vacina viva modificada: o mesmo que vacina atenuada.

Vacinação: imunização ativa pela administração de preparações de antígenos.

Vacinação perifocal: vacinação realizada em populações de indivíduos localizadas ao redor de um foco de uma doença infecciosa, para impedir que o agente se dissemine a partir do foco.

Vacúolo: vesícula intracelular.

Vacuolização: formação de vacúolos intracelulares.

Variação antigênica: variação nos componentes de superfície (epitopos) que são reconhecidos pelos mecanismos efetores do sistema imunológico (anticorpos e linfócitos T).

Variação cíclica: variação na incidência de uma determinada doença que ocorre ciclicamente a intervalos maiores do que um ano.

Variante viral: vírus com alguma diferença fenotípica em relação ao vírus parental.

Variolação: procedimento empírico de imunização de pessoas contra a varíola, em que crostas e líquido de vesículas de pessoas doentes eram administrados a indivíduos susceptíveis para imunizá-los.

Vazio sanitário: período em que uma determinada área, propriedade ou instalação é deixada sem animais para se assegurar da inexistência de possíveis agentes patogênicos anteriormente presentes.

Veículo: o mesmo que fômite.

Velogênica: denominação dada a amostras muito patogênicas do NDV.

Vetor bacteriano: bactéria utilizada para carrear genes heterólogos (virais) com fins vacinais.

Vetor biológico: inseto que participa biologicamente da transmissão de um agente infeccioso. O agente geralmente é amplificado ou desenvolve alguma fase do seu ciclo no organismo do vetor para, então, ser transmitido.

Vetor mecânico: inseto que participa apenas mecanicamente da transmissão de um agente infeccioso.

Vetor vacinal: organismo que carrega genes heterólogos (de outro organismo) e é utilizado para imunizar hospedeiros.

Via de excreção: via pela qual os agentes infecciosos são excretados do hospedeiro.

Via de penetração: via pela qual os agentes infecciosos penetram no hospedeiro.

Vigilância epidemiológica: conjunto de atividades utilizadas para monitorar continuamente a situação epidemiológica de uma determinada doença em uma população.

Viremia: presença de vírus no sangue.

Viremia ativa: viremia derivada da replicação viral em tecidos do hospedeiro.

Viremia passiva: viremia derivada da introdução direta dos vírus no sangue.

Viremia primária: viremia que se segue à replicação primária. Ocorre precocemente durante a infecção.

Viremia secundária: viremia derivada da replicação viral nos órgãos e tecidos-alvo. Ocorre mais tardiamente durante a infecção.

Vírião: unidade estrutural dos vírus; partícula vírica completa, infecciosa. Também denominada partícula viral.

Viroplasma: local intracelular de replicação e morfogênese dos vírus. O mesmo que fábrica viral.

Virose: denominação genérica das doenças causada por vírus.

Virossomo: estrutura citoplasmática grande onde ocorrem várias etapas do ciclo replicativo dos reovírus. Contém proteínas e ácidos nucleicos virais, capsídeos em diversas fases de maturação e membranas celulares.

Virulência: propriedade que se refere à gravidade da doença causada pelo agente.

Vírus atenuado: vírus com patogenicidade e virulência reduzidas (ou abolidas).

Vírus citolítico (ou lítico): vírus cuja replicação resulta em lise e destruição celular.

Vírus citopatogênico (ou citopático): vírus cuja replicação resulta em patologia celular (citopatologia).

Vírus com marcador antigênico: vírus que possui uma composição protéica diferente do vírus parental e que, por isso, induz no hospedeiro uma resposta sorológica que pode ser distinguida da resposta montada contra o vírus parental.

Vírus de campo: o vírus original que circula na natureza. Constitui-se no vírus parental com o qual os mutantes e variantes são comparados.

Vírus DNA: vírus que possuem o ácido desoxirribonucleico (DNA) como genoma.

Vírus emergente: vírus que assumiu importância recentemente.

Vírus helper: vírus que complementa determinadas funções e permite a replicação de vírus defectivos.

Vírus heterólogo: vírus de outra espécie viral ou outra cepa.

Vírus homólogo: vírus da mesma espécie viral e/ou mesma cepa.

Vírus pH-dependente: vírus cuja fusão e penetração na célula hospedeira dependem da redução do pH, ocorrendo em compartimentos intracelulares.

Vírus pH-independente: vírus cuja fusão e penetração na célula hospedeira ocorrem independentemente de redução de pH.

Vírus RNA: vírus que possuem o ácido ribonucleico (RNA) como genoma.

Vírus temperatura sensível (TS): variante viral que não replica com eficiência sob a temperatura corporal.

Vírus vetor: vírus utilizado para carrear informação genética (genes) de outros vírus ou organismos.

Vitronectina: componente protéico de membranas plasmáticas celulares, utilizado como receptor ou co-receptor por alguns vírus.

Zoonose: doença infecciosa transmissível entre os animais e o homem.

Western blot: técnica imunoenzimática de detecção de proteínas.